

3/7/4

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009606104

WPI Acc No: 1993-299652/199338

Novel polypeptide obtd. by culturing transformed fungus - having blood coagulation preventing, platelet aggregation preventing and thrombolytic activities

Patent Assignee: ASAHI CHEM IND CO LTD (ASAHI)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 5213998	A	19930824	JP 91282369	A	19910802	199338 B

Priority Applications (No Type Date): JP 91189984 A 19910730; JP 90204978 A 19900803

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 5213998	A		65 C07K-013/00	

Abstract (Basic): JP 5213998 A

A polypeptide of the amino acid sequence: (X) - (Y)

α -Glu-Cys-Pro-Glu-Gly- Tyr-Ile-Leu-Asp-Asp-Gly -Phe-Ile-Cyl-Thr-Asp-Ile-Asp-Glu (I) X = an amino acid residue or a peptide residue consisting of only Asp or Glu and Gla or a peptide residue consisting of a combination of at least two selected from the gp. consisting of Asp, Glu and Gla; Y = opt. amino acid residue or a peptide residue having 0 to 59 amino acid residues; Gla = gamma=carboxyglutamic acid residue; also claimed is a polypeptide having an amino acid sequence comprising (X) followed by 113 amino acid residues of formula (II).

Also claimed are a recombinant DNA in which a DNA coding the above peptide and the DNA are recombined to a vector, a microorganism or an animal cell transformed by the above recombinant DNA, the prepn. of the above peptide in which a filamentous fungus transformed by the above recombinant DNA is cultured, and a drug contg. the above peptide as the active component.

USE/ADVANTAGE - The peptide has blood coagulation preventing, platelet aggregation preventing and thrombolytic activities

Dwg.0/0

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-013/00

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-007/08;

C07K-099-00; C12N-001/15; C12N-001/21; C12N-005/10; C12N-015/12; C12P-021/02; C12R-001-645; C12R-001-01; C12R-001-91

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-213998

(43)公開日 平成5年(1993)8月24日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00	Z N A	8619-4H		
A 6 1 K 37/02	A C B	8314-4C		
C 1 2 N 1/15		7236-4B		
		7236-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数6(全 65 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-282369

(22)出願日 平成3年(1991)8月2日

(31)優先権主張番号 特願平2-204978

(32)優先日 平2(1990)8月3日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(31)優先権主張番号 特願平3-189984

(32)優先日 平3(1991)7月30日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 図師 通孝

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(72)発明者 五味 駒一

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(72)発明者 山本 修司

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 荻上 豊規

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なポリペプチド及びこれを有効成分とする 医薬組成物

(57)【要約】 (修正有)

【構成】以下のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(X) - (Y) _a-G l u-C y s-P r o-G l u-G l y-T y r-I l e-L e u-A s p-A s p-G l y-P h e-I l e-C y s-T h r-A s p-I l e-A s p-G l u

(但し、Xは、A s pまたはG l uおよびG l aのみからなるアミノ酸残基またはペプチド残基、またはA s pとG l uおよびG l aから成る群から選ばれる少なくとも2コ以上の組み合わせよりなるペプチド残基である。Yは、任意のアミノ酸残基またはペプチド残基であり、その長さはアミノ酸残基数として、0以上58以下のものである。なお、前記G l aは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す。)

【効果】本発明のペプチドは抗血液凝固と血小板凝集抑制作用および血栓溶解作用を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(X) - (Y) α -Glu-Cys-Pro-Glu-Gly-Tyr-Ile-Leu-Asp-Asp-Gly-Phe-Ile-Cys-Thr-Asp-Ile-Asp-Glu

(但し、Xは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基またはペプチド残基、またはAspとGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2コ以上の組み合わせよりなるペプチド残基である。Yは、任意のアミノ酸残基またはペプチド残基であり、その長さはアミノ酸残基数として、0以上58以下のものである。なお、前記Glaは、 γ -カルボキシグルタミン酸残基を示す。)

【請求項2】 以下のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド。

(X) - Pro-Cys-Phe-Arg-Ala-Asn-Cys-Glu-Tyr-Gln-Cys-Gln-Pro-Leu-Asn-Gln-Thr-Ser-Tyr-Leu-Cys-Val-Cys-Ala-Glu-Gly-Phe-Ala-Pro-Ile-Pro-His-Glu-Pro-His-Arg-Cys-Gln-Met-Phe-Cys-Asn-Gln-Thr-Ala-Cys-Pro-Ala-Asp-Cys-Asp-Pro-Asn-Thr-Gln-Ala-Ser-Cys-Glu-Cys-Pro-Glu-Gly-Tyr-Ile-Leu-Asp-Asp-Gly-Phe-Ile-Cys-Thr-Asp-Ile-Asp-Glu-Cys-Glu-Asn-Gly-Gly-Phe-Cys-Ser-Gly-Val-Cys-His-Asn-Leu-Pro-Gly-Thr-Phe-Glu-Cys-Ile-Cys-Gly-Pro-Asp-Ser-Ala-Leu-Val-Arg-His-Ile-Gly-Thr-Asp-Cys

(但し、Xは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基またはペプチド残基、またはAspとGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2コ以上の組み合わせよりなるペプチド残基である。)

【請求項3】 請求項1または2に記載したペプチドをコードするDNAと該DNAをベクターに組み込んだ組換え体DNA。

【請求項4】 請求項3に記載した組換え体DNAによ

り形質転換された微生物または動物細胞。

【請求項5】 請求項3記載の組換え体DNAにより形質転換された糸状菌類を培養することにより請求項1または2記載のペプチドを製造する方法。

【請求項6】 トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び／又はトロンビンのプロテインC活性化の促進作用を有することを特徴とする請求項1または2に記載したペプチドを有効成分とする薬剤。

【発明の詳細な説明】

10 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なペプチドに関するものである。また、本発明は、特にトロンビンと結合してトロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び／又はトロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチド及び、これらのペプチドを用いた薬剤に関するものである。これらのペプチドは血液の凝固に対する抗凝固系や線溶系に関与することから医薬品、特に血液凝固障害を伴う疾患、例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の治療剤として有用である。

20

【0002】 本明細書において、アミノ酸配列及びペプチドは下記に示すIUPAC-IUB生化学命名委員会(CBN)で採用された略号を用いる。なお、アミノ酸などに関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しない限りペプチドのアミノ配列の左端及び右端はそれぞれN末端及びC末端である。

【0003】 本明細書におけるアミノ酸残基の略号は下記の通りのものである。

30 Gln: グルタミン残基

Asp: アスパラギン酸残基

Pro: プロリン残基

Tyr: チロシン残基

Val: バリン残基

Lys: リジン残基

Glu: グルタミン酸残基

Ala: アラニン残基

Asn: アスパラギン残基

Leu: ロイシン残基

40 Phe: フェニルアラニン残基

Gly: グリシン残基

His: ヒスチジン残基

Ser: セリン残基

Thr: スレオニン残基

Ile: イソロイシン残基

Trp: トリプトファン残基

Arg: アルギニン残基

Met: メチオニン残基

Cys: シスチン残基

50 Gla: γ -カルボキシグルタミン酸残基

またポリデオキシヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドは、下記の如き略号で表されるデオキシリボヌクレオチドの配列によって表記する。

A : アデニン (デオキシアデニル酸)

C : シトシン (デオキシシチジル酸)

G : グアニン (デオキシグアニル酸)

T : チミン (デオキシチミジル酸)

別段記載のない限り、デオキシボヌクレオチド配列の左端及び右端はそれぞれ5' 末端及び3' 末端である。

【0004】

【従来の技術】血液凝固機構において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質としてプロテインCが知られている。近年、そのプロテインCの活性化を促進し、トロンビンの作用による血小板の活性化とフィブリン形成を抑制するような物質が、ウサギの肺、ヒトの肺や胎盤等に存在することが報告され、それらはトロンボモジュリン (Thrombomodulin) と称されている。

【0005】また、N. L. Esmonら (J. Biol. Chem. 257. 859-864 (1982)) は、ウサギの肺より精製した上記物質がトロンビンと結合し、プロテインCを活性化する際にカルシウムイオンを必要とすることを報告している。また、K. Suzukiら (Biochemica et Biophysica Acta 882. 343-352 (1986)) は、ウシの肺より精製した上記物質について、またH. H. Salemら (J. Biol. Chem. 259. 12246-12251 (1984)) は、ヒト胎盤より精製した上記物質について同様に、トロンビンと結合後、プロテインCを活性化する際にカルシウムイオンが必要であると報告している。さらに、S. Kurosawaら (J. Biol. Chem. 262. 2206-2212 (1987)) は、ウサギの肺より精製した上記物質をエラストーゼで切断した可溶性のペプチドは、プロテインCの活性化の際には、0.3mMのカルシウムイオン濃度で活性の極大値を示し、Glaドメインを取り除いたプロテインC (以下GDPCと略す。)の活性化の際にはそのようなカルシウムイオン濃度依存性を示さないことを報告している。

【0006】ところでヒト由来の上記物質即ち、トロンボモジュリンのcDNAのクローニングについては、本発明者らは先に明らかにした (S. Yamamotoら国際公開番号WO88/05033参照)。

【0007】一方、近年の遺伝子操作技術の進歩により、蛋白質中の任意アミノ酸を他のアミノ酸に置換したり、蛋白質中の任意の部位のアミノ酸配列を欠失せたりすることが可能になった。このように天然に存在する蛋白質を改変して特定の目的にかなった新しい蛋白質を創製する研究がなされている。ヒトトロンボモジュリンについては、本発明者らは、115アミノ酸からなるペ

プチドがトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する活性を有していることを先に明らかにした (M. Zushiら, J. Biol. Chem. 264. 10351-10353 (1989) 参照)。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】血液凝固障害の治療における蛋白製剤の投与方法としては、点滴による静注、PTCR (percutaneous transluminal coronary recanalization) による局所投与等が主流である。このような投与方法は、短期的な治療においては許容できるが、長期にわたる治療が必要な患者、あるいは予防的な投与が必要な患者に対しては問題がある。即ち、蛋白質が高分子量を有することから、一定の効果をを得るために比較的大量の製剤の投与が必要となる。ところがこの場合、抗原性発現の危険を患者に与えることがある。更に長期間の通院が必要な患者にとって精神的、経済的負担になる。ヒトトロンボモジュリンの投与方法として現在可能と考えられているのは、静注によるものである。

20 【0009】このような状況から、より高い活性を有する、より低分子のトロンボモジュリン活性を有するペプチドの開発が望まれている。また、静注、局所投与等によらない投与方法、例えば、経口投与の可能なトロンボモジュリン製剤の開発も望まれている。本発明の目的は、上記要望に応えるトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する新規なペプチドを提供することにある。

【0010】本発明の他の目的は、上記ペプチドをコードするDNAを提供することにある。

30 【0011】本発明の更に他の目的は、上記ペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んだ組換えDNAを提供することにある。

【0012】本発明の更に他の目的は、上述のような組換えDNAによって形質転換された微生物、及び動物細胞を提供することにある。

【0013】本発明の更に他の目的は、上述の組換えDNAによって形質転換された真菌類を培養することによる上記ペプチドの製造方法を提供することにある。

40 【0014】本発明の更に他の目的は、上記ペプチドを有効成分として含有する医薬組成物を提供することにある。

【0015】

【課題を解決しようとする手段】前述したように、本発明者らは、遺伝子組換えの手法を用いてトロンビンのプロテインCの活性化を促進するペプチドの開発を進めていたが、ヒトトロンボモジュリンの575個よりなるアミノ酸配列中において、115個のアミノ酸よりなるペプチドが上記活性を有していることを先に明らかにした (M. Zushiら, J. Biol. Chem. 264. 10351-10353 (1989) 参照)。

【0016】本発明者らは、上記のペプチド中において、トロンビンのプロテインC活性化を促進する作用に必須な領域を同定すべく、引き続き鋭意研究を行った。その結果、トロンボモジュリンのプロテインC結合能付与配列の同定およびトロンボモジュリンのトロンビン結合部位を含むアミノ酸配列の同定に成功した。更に、上記2つの配列を有するペプチドが、動物細胞、および各種微生物において効率よく発現されることを確認し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0017】即ち、本発明は以下のアミノ酸配列からなるポリペプチドを提供する。

(X) - (Y) α -Glu-Cys-Pro-Glu-Gly-Tyr-Ile-Leu-Asp-Asp-Gly-Phe-Ile-Cys-Thr-Asp-Ile-Asp-Glu

(但し、Xは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基またはペプチド残基、またはAspとGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2コ以上の組み合わせよりなるペプチド残基である。Yは、任意のアミノ酸残基またはペプチド残基であり、その長さはアミノ酸残基数として、0以上58以下のものである。)

【0018】本発明はまた以下のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチドを提供する。

(X) - Pro-Cys-Phe-Arg-Ala-Asn-Cys-Glu-Tyr-Gln-Cys-Gln-Pro-Leu-Asn-Gln-Thr-Ser-Tyr-Leu-Cys-Val-Cys-Ala-Glu-Gly-Phe-Ala-Pro-Ile-Pro-His-Glu-Pro-His-Arg-Cys-Gln-Met-Phe-Cys-Asn-Gln-Thr-Ala-Cys-Pro-Ala-Asp-Cys-Asp-Pro-Asn-Tyr-Gln-Ala-Ser-Cys-Glu-Cys-Pro-Glu-Gly-Thr-Ile-Leu-Asp-Asp-Gly-Phe-Ile-Cys-Thr-Asp-Ile-Asp-Glu-Cys-Glu-Asn-Gly-Gly-Phe-Cys-Ser-Gly-Val-Cys-His-Asn-Leu-Pro-Gly-Thr-Phe-Glu-Cys-Ile-Cys-Gly-Pro-Asp-Ser-Ala-Leu-Val-Arg-His-Ile-Gly-Thr-Asp-Cys

(但し、Xは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基またはペプチド残基、またはAsp

とGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2コ以上の組み合わせよりなるペプチド残基である。)

【0019】更に本発明は、上述した二者のペプチドについて、それをコードするDNAと該DNAをベクターに組み込んだ組換え体DNAを提供する。

【0020】更に本発明は、前記組換え体DNAにより形質転換された微生物または動物細胞を提供する。

【0021】更に本発明は、上述した組換え体DNAにより形質転換された真菌類を培養することにより上述した二者のペプチドのいずれかを製造する方法を提供する。

【0022】更に本発明は、トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び/又はトロンビンのプロテインC活性化の促進作用を有することを特徴とする上述した二者のペプチドのいずれかを有効成分とする薬剤を提供する。

【0023】本発明者らは本発明の完成に至る過程において、まずヒトトロンボモジュリンのプロテインCとの結合部位の同定を行った。即ち、本発明者らが先に明らかにした上述の115個のアミノ酸からなるペプチドをコードするDNA断片をM13ファージベクターにサブクローニングし、公知の部位特異的変異の手法を用い、115アミノ酸のペプチドのN末端から1アミノ酸あるいは、2アミノ酸のデリーションを行い、ヒトトロンボモジュリンの欠失変異体をコードするDNA断片を2種作製し、動物細胞の発現ベクターであるpSV2を用いて、COS-1細胞において発現させたところ、驚くべきことに、以下の実施例1に示すごとく、上記の115アミノ酸からN末端の1アミノ酸(Val)をdeletionした114アミノ酸のペプチドは115アミノ酸のペプチドと同レベルの比活性を有しているが、N末端より2アミノ酸(ValAsp)をdeletionした113アミノ酸のペプチドでは著しく比活性が低下していた。

【0024】すなわち、ヒトトロンボモジュリンペプチドの全アミノ酸配列(図55)中の367番目に位置するアスパラギン酸(以後このアスパラギン酸をAsp³⁶⁷と称する。)がヒトトロンボモジュリンのトロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用に必須であるということが明らかになった。

【0025】更に、この114アミノ酸のペプチドのC末端側の38アミノ酸を欠失した変異体(E45)を構築し、その活性を調べたところ、十分な活性を有するものの114アミノ酸ペプチドの約10分の1に活性が低下することが明らかとなった。

【0026】更に、このAsp³⁶⁷の機能を解析するためにヒトトロンボモジュリンの全アミノ酸配列(図55)中の1番目から516番目のアミノ酸配列をコードするDNAをM13ファージベクターにサブクローニン

グし、公知の部位特異的変異の手法により変異用合成DNAを用いAsp³⁶⁷をコードする位置のDNAの塩基の置換を行い、Asp³⁶⁷の位置のアミノ酸を、他のアミノ酸、例えばAla, Glu等のアミノ酸に置換したペプチドをコードするDNAを作製した。これらのDNAを動物細胞の発現ベクターであるpSV2を用いて、COS-1細胞において発現させ、イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、そのトロンビンによるプロテインCの活性化促進能を測定したところ、後述の実施例1に記載したように電荷を持たないアミノ酸、例えばAlaに変換するとプロテインCの活性化能は、著しく低下することが判った。更にAspと同じようなマイナス電荷をもつアミノ酸、例えばGluやγ-カルボキシグルタミン酸に変換するとプロテインCの活性化能は変異前より高いレベルにまで上昇することが判った。これらの判明した事実から、ヒトトロンボモジュリンのAsp³⁶⁷は、プロテインCとの結合能を付与する部位であり、これには、Aspの側鎖の持つマイナス電荷が重要に関わるということが明らかになった。また、意外にも、Asp³⁶⁷はAsp, Glu, γ-carboxyglutamic acidから選ばれる少なくとも2つのアミノ酸残基より成るペプチド又はポリペプチド残基で置換できることを見出した。

【0027】本発明者らは更に、ヒトトロンボモジュリンとトロンビンとの結合部位を同定するために、上述した115個のアミノ酸からなるペプチドを基に、公知の部位特異的変異の手法を介して特定のアミノ酸配列の欠失を行い、ヒトトロンボモジュリンの366番目から442番目のペプチド及び、407番目から480番目のペプチドをコードするDNAを作製し、pSV2ベクターを用いCOS-1細胞で発現させ、発現したペプチドを精製し、トロンビンとの結合能を調べたところ、両者のペプチドはともに結合能を有していた。そこで、2つのペプチドが共通に持つアミノ酸配列がトロンビンとの結合部位と考え、406番目から444番目のアミノ酸配列をもとに3種類のペプチドを市販のペプチド合成機を用い常法に従って合成し、トロンボモジュリンとトロンビンとの結合の阻害を調べたところ、後述の実施例2に述べたごとく19個のアミノ酸からなる特定の塩基配列(Glu-Cys-Pro-Glu-Gly-Tyr-Ile-Leu-Asp-Asp-Gly-Phe-Ile-Cys-Thr-Asp-Ile-Asp-Glu)を有するペプチドがヒトトロンボモジュリンとトロンビンとの結合部位を含むことがわかった。

【0028】これらの知見に基づき、実施例3、4、5に示すように本発明者らは、ヒトトロンボモジュリンのプロテインCに対する結合能を付与する部位及び、トロンビンとの結合部位を含むアミノ酸配列を有する従来未知のペプチドを作製した。

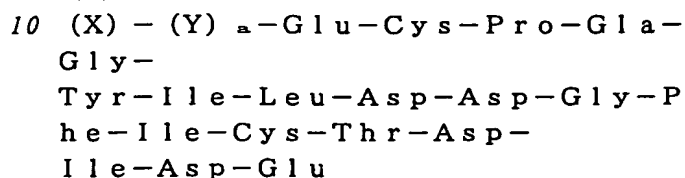
【0029】よって、本発明は、トロンビンのプロテ

ンCの活性化を促進する作用を有する新規なペプチドを提供する。

【0030】本発明は、更に、トロンボモジュリンの投与方法として、静注によらない投与、例えば、経口投与、鼻腔投与を可能にする。

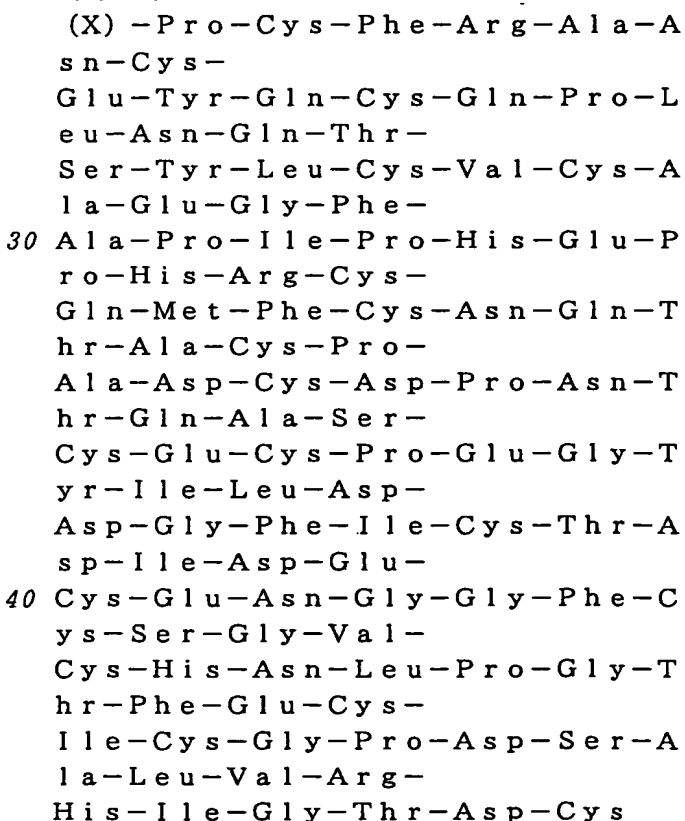
【0031】本発明により提供されるペプチドは下記の式(I)または式(II)で表されるアミノ酸から実質的になるものである。

式(I)：



(但し、Xは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基またはペプチド残基、またはAspとGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2コ以上の組み合わせよりなるペプチド残基である。Yは、任意のアミノ酸残基またはペプチド残基であり、
20 その長さはアミノ酸残基数として、0以上58以下のものである。なお、前記Glaは、γ-カルボキシグルタミン酸残基を示す。)

式(II)：



(但し、Xは、AspまたはGluおよびGlaのみからなるアミノ酸残基またはペプチド残基、またはAspとGluおよびGlaから成る群から選ばれる少なくとも2コ以上の組み合わせよりなるペプチド残基であ

る。))。

【0032】本発明のペプチド中のプロテインC結合部位であるXの長さは、結合する相手であるプロテインCのG1aドメイン中のG1a残基の数から考えて1~20残基以内、好ましくは1~10残基である。

【0033】本発明のペプチドはまた、上記式(I)または式(II)で表されるアミノ酸配列と、そのN末端又は/及びC末端に結合した少なくとも1種の他のペプチドのアミノ酸配列を更に含有してもよい。

【0034】更に、自然の変異によりまたは、人工の変異により、ペプチドの活性に重大な変化を与えることなく、ペプチドの構造の一部を変化させることが可能であるから、本発明のペプチドは、前記アミノ酸配列を有するペプチドの相同変異体(Homologous variant)に相当する構造を有するペプチドも包含する。

【0035】本発明のペプチドは、少なくとも1個の糖残基を含有していても良いし、含有していなくてもよい。

【0036】また、本発明によれば、遺伝暗号の縮重に基づき少なくとも1個の塩基が置換されている、または置換されていない上記式(I)または(II)で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするデオキシリボ核酸が提供される。

【0037】本発明のDNAは、上記式(I)または(II)で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列とその5'末端及び/又は3'末端に結合した少なくとも1種の他の塩基配列とを含有していてもよい。

【0038】本発明によれば、上記DNAと相補的なDNAもまた提供される。本発明によれば、上記DNAとそれに相補的なDNAが互いに相補的に結合した2重鎖DNAを形成していてもよい。

【0039】自然の変異によりまたは人工的変異により主たる活性に変化を与えることなく、DNAの構造及びそれから演繹されるペプチドの構造の一部を変異せしめることが可能であるから、本発明のDNAは、前述のすべてのペプチドの相同変異体に相当する構造を有するペプチドをコードする塩基配列を含有することも可能である。

【0040】遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子から生産されるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくその遺伝子の塩基配列の少なくとも1つの塩基を他の種類の塩基に置換することができる。従って、本発明のDNAはまた、遺伝暗号の縮重に基づく置換によって変化した塩基配列を含有することも可能である。この場合、上記置換により得られた塩基配列から演繹されるアミノ酸配列は前に定義したアミノ酸配列と一致する。

【0041】更にまた、本発明によれば、前記の本発明のデオキシリボ核酸をベクターに組み込んだ組換え体DNAが提供される。該組換え体DNAは、それによって

形質転換された微生物または細胞中で、本発明のペプチドを発現することができる。適したベクターの例としては、プラスミドpBR322, pBR327, pUC18, pUC19, YRp7, YEplac24(ATCC37051), pPGACY2, pBSFAHY83, pSV2-dhfr(ATCC37146), pBPV-1(9-1)(ATCC37111)等が挙げられる。なお発現ベクターは宿主として使用する微生物または細胞に適したものを選択する必要がある。

- 10 【0042】更に本発明はまた、上述の組換え体DNAで形質転換された微生物または細胞に関する。微生物の例としては、エシエリヒア コリ(*Escherichia coli*)の菌株、例えば、*E. coli* K12株294(ATCC31446)、*E. coli* B株、*E. coli* X1776(ATCC31537)、*E. coli* C600、*E. coli* JM105; バチラス サブチリス(*Bacillus subtilis*)または、セラチアマーセサンス(*Serratia marcescens*)等の大腸菌以外の腸内菌; シュードモナス(*Pseudomonas*)属の種々の菌株; およびサッカロミセス セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*); アスペルギルス ニドランス(*Aspergillus nidulans*)、アクレモニウム クリソゲナム(*Acremonium chrysogenum*)(ATCC11550)等の真菌類等が挙げられる。細胞の例としては、VERO細胞(ATCCCL-81)、Hela細胞、チャイニーズハムスター(CHO)細胞、W138、BHK、COS-1およびMD
- 20 CK細胞等の動物細胞が挙げられる。

【0043】本発明の方法によれば、前述の本発明のDNAが正しく転写し、それによって得られるmRNAからの翻訳が正しく行われるように本発明のDNAを複製可能な発現ベクターのプロモーター等のDNA領域の下流に組み入れて該DNAを有する複製可能な組換え体DNAを得、得られた該組換え体DNAで微生物または細胞を形質転換させて該組換え体DNAを含有する形質転換体を得る。得られた形質転換体は、該組換え体DNAに与えられた表現型によって微生物または培養細胞の親

40 細胞から単離される。得られた形質転換体を培養して前記デオキシリボ核酸の有する遺伝情報を発現させて本発明のペプチドを製造する。

【0044】なお、本発明のDNAおよび組換え体DNAを構築するために必要なDNA配列、例えばプロモーターや複製起源等をクローニングするためには原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系を使用するのが好ましい。原核細胞の例としてはエシエリヒア コリ(*Escherichia coli*)の菌株、例えば、イー・コリ(*E. coli*) K12株294(ATCC31446)、イー・コリ(*E. coli*) B株、イー・

50

コリ (*E. coli*) X1776 (ATCC31537)、イー・コリ (*E. coli*) C600、およびイー・コリ (*E. coli*) C600hfl並びに、イー・コリ (*E. coli*) W3110 (F⁻、λ⁻、プロトトロフィック、ATCC27375)；パチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*) のごときパチラス (*Bacillus*) の属の菌株；サルモネラ チフィウム (*Salmonella typhimurium*) または、セラチア マーセサンス (*Serratia marcescens*) 等の大腸菌以外の腸内細菌；シュードモナス (*Pseudomonas*) 属の種々の菌株；およびサッカロミセス セレビス (*Saccharomyces cerevisiae*)；等が挙げられる。これらの細胞のうちエシエリヒア コリ (*E. coli*) K12株294が最も好ましい。上記微生物を宿主として使用する場合、これら微生物に適したプラスミドベクターが組換え体DNAの複製可能な発現ベクターとして一般に用いられる。例えば大腸菌を形質転換するためのプラスミドベクターとしてはプラスミドpBR322やpBR327、pUC18、pUC19等を用いることができる。プラスミドベクターは通常複製起源、プロモーター、および組換え体DNAで形質変換した細胞を選別するのに有用な表現型を組換え体DNAに与えるマーカー遺伝子等を含んでいる。プロモーターの例としては、β-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター、トリプトファンプロモーター等が挙げられる。マーカー遺伝子の例としては、アンピシリン耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。一方、本発明のDNAを発現して本発明のペプチドを製造するためには上記の原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系および脊椎動物の細胞等の真核生物の細胞を宿主細胞として用いる宿主-ベクター系を使用することができる。真核細胞の例としては前述の動物の細胞株等の細胞が挙げられる。本発明のDNAを前述の真核細胞で発現させるために、本発明の組換え体DNAは一般に遺伝子発現を制御するための機能配列、例えば、複製起源、本発明のDNAの上流に位置すべきプロモーター、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位や転写終止配列を含有している。本発明のDNAを真核細胞内で発現させるのに用いることができるそのような機能配列はウイルスやウイルス性物質から得ることができる。

【0045】例えば、本発明で用いることのできるプロモーターはアデノウイルス2、ポリオマウイルス、シミアンウイルス40 (SV40) 等から得ることができる。特に、アデノウイルス2の主後期プロモーターやSV40の初期および後期プロモーターが好ましい。また、トロンビンのプロテインC活性化を促進する作用を有するヒト肺由来のペプチドをコードする遺伝子の上流の位置に本来存在するプロモーターも、上述の宿主-ベ

クター系で使用するのに適しているならば使用することができる。

【0046】複製起源については、外来性の起源、例えば、アデノウイルス、ポリオマ、SV40、水泡性口内炎ウイルス (VSV)、ウシ乳頭腫ウイルス (BPV) 等のウイルス由来の複製起源を用いることができる。また、発現ベクターとして宿主染色体に組み込まれるような性質を有するベクターを用いる場合、宿主染色体の複製起源を利用することができる。

- 10 【0047】本発明の複製可能な組換え体DNAで形質転換された微生物または細胞は、前述のとおり、組換え体DNAに与えられた少なくとも1種の表現型によって形質転換されずに残った親細胞から選別される。表現型は少なくとも1種のマーカー遺伝子を組換え体DNAに挿入することによって与えることができる。また、複製可能な発現ベクターが本来有しているマーカー遺伝子を利用することもできる。マーカー遺伝子の例としては、例えば、ネオマイシン耐性等の薬剤耐性遺伝子やジヒドロ葉酸レダクターゼ (以下“DHFR”と称する。) をコードする遺伝子等が挙げられる。これに関し、DHFR遺伝子をマーカー遺伝子として用いる場合、DHFRには様々のタイプがあるため、その使用するマーカー遺伝子のコードしているDHFRのタイプによって用いるべき宿主を選ばなければならない。例えば、マーカー遺伝子として野生型DHFRをコードする遺伝子を用いる場合、宿主としてはDHFR欠損株を用いるのが好ましい。DHFR欠損株はヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを要求するので、ヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを含まない培地中では成育できない。しかしながら、DHFR欠損株をDHFR遺伝子を含有する組換え体DNAで形質転換すると、その株はもはやヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを要求しなくなり、ヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを含まない培地中でも成育することができる。従って、形質転換細胞は、ヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンについての栄養要求性を判断基準にして形質転換されないで残った細胞から容易に選択することができる。

- 【0048】一方、メトトレキセート (MTX) に対する親和性の低い変異体DHFRをコードする遺伝子 (以下“MTX耐性DHFR遺伝子”と称する。) をマーカー遺伝子として用いる場合には、宿主細胞は正常なDHFRをコードする遺伝子を有していてもよくDHFRを欠損している必要はない。その理由は以下のとおりである。正常DHFRはMTXによって阻害されるため、正常DHFRをコードする遺伝子を含有する宿主細胞はMTXの存在下ではヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを要求する。しかしながら、その宿主細胞がMTX耐性DHFR遺伝子を含有する組換え体DNAで形質転換すると形質転換細胞はMTX存在下においてももはやヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンを要求しな

い。従って、形質転換細胞は、MTX存在下におけるヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンについての栄養要求性を判断基準として用いて形質転換されていない細胞から選択することができる。これに関し、真核細胞の大多数がMTX感受性であるのでMTX耐性DHFR遺伝子はマーカー遺伝子として用いるのに好都合である。

【0049】サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等の酵母も本発明のDNAを発現するための宿主として用いることができる。酵母で本発明のDNAを発現するためには複製可能な発現ベクターとして例えばプラスミドYEp24を用いることができる。プラスミドYEp24はUra3遺伝子を含有しており、このUra3遺伝子をマーカー遺伝子として利用することができる。

【0050】酵母細胞用の発現ベクターのプロモーターの例としては、3-ホスホグリセレートキナーゼまたはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルベートデカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、グルコキナーゼ、等の解糖系に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターやアルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関与する酵素、ガラクトース、マルトースおよびラクトースの利用に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらのうち、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関与する酵素類、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、およびガラクトース、マルトースおよびラクトースの利用に関与する酵素類の遺伝子のプロモーターは、これらのプロモーターによる転写を宿主の培養条件を変えることによって制御することができるので有利である。

【0051】酵母細胞中における転写や翻訳を制御するための複製起源や終止コドンおよびその他のDNA配列としては、酵母細胞に適している通常の公知のDNA配列を用いることができる。

【0052】アスペルギラス・ニドランス (*Aspergillus nidulans*) およびアクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium Chrysogenum*) (ATCC11550) 等の糸状菌も本発明のDNAを発現するための宿主として用いることができる。糸状菌で本発明のDNAを発現するためには発現ベクターとして例えばpPGACY2, pBSFAHY83等は、松田ら(特願平2-166566)に記載された方法により得ることができる。

【0053】アクレモニウム・クリソゲナム用の発現ベクターのプロモーターおよび、ターミネーターの例としては、例えば、ホスホグリセレートキナーゼ(PGK)、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPD)、アクチン等の遺伝子のプロモ-

ーター並びにターミネーターが挙げられる。これらのプロモーターおよびターミネーターを含むDNA断片は、例えば、後述の参考例2-(1)に記載されている方法に従ってアクレモニウム・クリソゲナムの染色体ライブラリーから取得できる。

【0054】形質転換した微生物または細胞は通常の栄養培地を用いて通常の公知の方法で培養することにより本発明のペプチドをコードするDNAを発現して本発明のペプチドを製造することができる。培養後、本発明のペプチドは形質転換体の培養物から通常の公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィー等用いて単離することができる。

【0055】このようにして得られたペプチドは様々な種類と長さの糖鎖を少なくとも1種含有していてもよい。得られたペプチドが糖鎖を含有しているか否かは用いる宿主細胞の種類によって異なる。また、ペプチドが糖鎖を含有している場合の糖鎖の種類や長さも用いる宿主細胞の種類によって異なる。

【0056】一般に翻訳開始シグナルのATGから翻訳されたペプチドは宿主細胞から分泌されるときにプロセッシングを受けて成熟蛋白になることが知られている。本発明のペプチドの場合もそのようなプロセッシングを受けることがある。ペプチドがプロセッシングを受ける部位は、宿主により、または培養条件により変化する場合がある。例えば、本発明のペプチドが上記式(I)または式(II)で表されるペプチドとリーダー配列とを含むプロセッシングを受けていない未成熟形で形質転換細胞中で産生される場合、その未成熟形ペプチドはプロセッシングを受けてリーダー配列が削除されて成熟形となることがある。しかしながら、前述のように未成熟形ペプチドのプロセッシングを受ける位置は使用する宿主の種類や宿主の培養条件により変化するので必ずしも上記のようなプロセッシングが起きるとは限らない。

【0057】また、他の蛋白のリーダー配列を用いても本発明のペプチドを発現させることができる。更に特定の蛋白のリーダー配列を使用すればそれに続くペプチドのアミノ酸に修飾を行うことができる。例えば、プロトロンビン、血液凝固第IX因子、血液凝固第X因子、血液凝固第VII因子、プロテインC、プロテインS等のリーダー配列を用いれば、それに続くペプチド中のN末端部分付近のグルタミン酸をγ-カルボキシル化することができる(B. Furieら、Blood、75、9、1753-1762(1990))。

【0058】前述のとおり、本発明のペプチドは組換えDNA技術を用いる方法により製造することができる。また、本発明のペプチドは通常の公知の方法により、例えば市販の自動ペプチド合成装置等を用いて有機合成により製造することもできる。

【0059】本発明のペプチドはトロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用を有する。プロテインC

は血液凝固線溶機構において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質であり、トロンビンの作用により活性化される。活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系補酵素の活性型第V因子、および活性型第VII因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノーゲンアクベーターの産生に関与していることが知られている(鈴木宏治、医学の歩み、第125巻、901頁(1983年))。本発明のペプチドは、このトロンビンによるプロテインCの活性化を促進して抗血液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性型プロテインCを大量に産生せしめるものである。従って、本発明のペプチドは生体における抗血液凝固および血栓溶解に大きく寄与するものである。

【0060】前述のように、本発明のペプチドは抗血液凝固と血小板凝集抑制作用および血栓溶解作用を有するので例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の疾患の治療および予防に用いることができる。本発明のペプチドを上記の疾患の治療に用いる際には薬剤として使用可能な担体と混合することができる。即ち、上記の疾患を治療または予防するのに有効な量の本発明のペプチドを適当な量の担体と混ぜて、患者に効果的に投与するのに適した医薬組成物を調製することができる。本発明のペプチドは注射剤等として用いることができるばかりでなく、経口投与、粘膜投与、例えば鼻粘膜を介しての投与も可能な組成物を調製することもできる。

【0061】本発明の生理活性物質の成人1回当たりの投与量は年齢、性別、体重、症状等により異なるが、一般に約0.1~200mgであり、一日当たり一回または必要に応じて数回投与する。

【0062】以下に実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらの例に何ら限定されるものではない。

【0063】

【実施例】

実施例1

ヒトトロンボモジュリンのプロテインCとの結合能を付与するアミノ酸配列の同定

(1) pSV2TMD7、pSV2TMD8の構築

(a) プラスミドM13mp19TMD3の構築

国際出願特許(国際公開番号WO88/05053)の実施例1-(1)に記載されたpSV2TMJ2(ATCC寄託番号67283号)をNcoIで完全消化後、切断末端をE. coli DNAポリメラーゼを用いて平滑末端にした。次いでHindIIIで完全消化して約1900bpのDNA断片を得た。得られたDNA断片をTMJ3と称した。一方ファージM13mp19(宝酒造、カタログ番号3119)をHindIII及び、HincIIで消化してベクターを調製した。この

ベクターにDNA断片TMJ3を挿入して組換え体プラスミドM13mp19TMJ3を得た。また、別途下記の塩基配列: 5'-GGAGGCCGCTCAACAGTCGGTGCCA-3'(25mer)を有する削除用DNAプローブ(以下、“ディリーター”と称する。)TMd3を有機合成した。

【0064】このように作製したディリーターTMd3を用いて、メソッド イン エンザイモロジー(Method in Enzymology), 第100巻、10468頁、(1983年)、アカデミックプレス(Academic Press)に記載の方法に従って部位特異的変異の手法で前記のごとく得られた組換え体プラスミドM13mp19TMJ3の285bpからなる塩基配列の削除を行った。

【0065】即ち、25pmolのディリーターTMd3及び10pmolのM13プライマーM3(宝酒造、カタログ番号3831)の5'末端をT4キナーゼを用いてリン酸化した後、0.5pmolの組換え体プラスミドM13mp19TMJ3のシングルスランドDNAを加え、95℃で5分間加熱後、室温にまで冷却した。次いで5単位のE. coli DNAポリメラーゼI(Klenow Fragment)、及び10単位のT4DNAリガーゼを混合物に加えて37℃で30分間インキュベートして混合物中に組換え体プラスミドを生成させた。得られた混合物をE. coli JM105(ファルマシア、カタログ番号27-1550)に加えることにより組換え体プラスミドでE. coliをトランスフェクトした。37℃で一晩培養して生じた寒天培地上のプラークをニトロセルロースフィルター上に移し取りアルカリで変性後、0.5Mのトリス緩衝液で中和する。その後、80℃で2時間加熱後、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションは、6×SET(0.9M NaCl、180mMトリス緩衝液(pH8.0)、6mM EDTA)、5×Denharts、(0.1%(w/v)ポリビニルピロリドン、0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA))、0.1% SDS、100μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中で55℃、2時間加温することにより実施した。ついで上記の溶液中の変性サケ精子DNAの代わりに³²PでラベルしたTMd3を加えた溶液を用いてハイブリダイゼーション反応を55℃、2時間実施した。次いで6×SSC(0.9M NaCl、0.09Mクエン酸三ナトリウムの水溶液)を用いてニトロセルロースフィルターを洗浄した。洗浄は、室温で5分間、2回洗ったのち、55℃、65℃、75℃と、段階的に温度を上げていって、それぞれ5分間2回ずつ洗った。X線フィルムXAR-5(イーストマンコダック)を得られたニトロセルロースフィルターに密着させて-80℃、一夜露出させたところ、X線フィルムに強く露光した黒いスポットが数10個検出された。各

スポットは組換え体プラスミドで感染したクローンに対応するものである。そのうち、6クローンを選択し、各クローンの組換え体プラスミドを単離して制限酵素解析、及び塩基配列の解析を行ったところ、これらのクローンの保有する組換え体プラスミドは、制限酵素部位と塩基配列がそれぞれ同一であるということがわかった。更にこのDNA断片は、配列表の開始コドン(ATG)から480番目までのアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有することがわかった。このDNA断片をTMD3と称し、このDNA断片を含む組換え体プラスミドをM13TMD3と称した。図1に組換え体プラスミドM13mp19TMJ3とディリターTMd3がハイブリダイズしてDNA断片TMJ3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。

【0066】(b) プラスミドpSV2TMD7の構築部位特異的変異の手法を用いてディリターTMd3の代わりに、下記の塩基配列: 5'-GAAGCACGGGTCGGGGAACCCAGG-3' (25mer) を有するディリターTMd5を用いる以外は上記実施例1-(1)-(a)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13TMD3の一部を削除して、1044塩基の削除を行い、TMD7と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMD7を得た。このTMD7は、配列表の開始コドン(ATG)から18番目のアミノ酸、及び367番目から480番目のアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第2図に組換え体プラスミドM13TMD3とディリターTMd5がハイブリダイズしてDNA断片TMD3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。更に、この組換え体プラスミドM13TMD7のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMD7の約580bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記580bp DNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMD7を得た。

【0067】(c) プラスミドpSV2TMD8の構築部位特異的変異の手法を用いてディリターTMd3の代わりに、下記の塩基配列S: 5'-TCTGAAGCACGGGGAACCCAGG-3' (25mer) を有するディリターTMd6を用いる以外は上記実施例1-(1)-(a)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13TMD3の一部を削除して、1047塩基の削除を行い、TMD8と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMD8を得た。このTMD8は、配列表の開始コドン(ATG)から18番目のアミノ酸、及

び368番目から480番目のアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第3図に組換え体プラスミドM13TMD3とディリターTMd6がハイブリダイズしてDNA断片TMD3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。更に、この組換え体プラスミドM13TMD8のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMD8の約580bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記580bp DNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMD8を得た。

【0068】(2) プラスミドpSV2TMD7、pSV2TMD8のCOS-1細胞へのトランスフェクション

COS-1細胞(ATCC CRL1650)を組織培養用シャーレ内で、10%(v/v)のウシ胎児血清(以下FCSと称する。ギブコ社)を加えたダルベッコの最小必須培地(以下DMEMと称する。)(フローラボラトリ社、カタログ番号10-311)を用いてコンフルエントになるまで培養した後、トリプシン液(0.25%トリプシン、0.02%EDTA含有PBS)を用いてシャーレから剥し、エレクトロポレーション用緩衝液(272mMサッカロース、1mM MgCl₂、7mMリン酸緩衝液pH7.4)に 8×10^6 個/mlの濃度となるように懸濁し、得られた細胞懸濁液500 μ lをエレクトロポレーション用キュベット(パイオラッド社、カタログ番号165-2085)に入れた。実施例1-(1)で構築したプラスミドpSV2TM7、pSV2TMD7のDNAを、それぞれ4 μ g/ μ lになるように0.1mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に懸濁し、20 μ gのプラスミドDNAを含む懸濁液5 μ lを上記のキュベット内のCOS-1細胞懸濁液に加え、0℃で10分間放置した。10分後キュベットをエレクトロポレーション装置(パイオラッドカタログ番号165-2075)に移し、3 μ F、450Vの条件で30秒おいて2回のパルスを与えた。その後、0℃で10分間放置後、細胞懸濁液を10%FCS(v/v)を加えたDMEM10mlの入った直径10cmの細胞培養用シャーレに移し、炭酸ガスインキュベーター内で37℃、24時間培養した。24時間後、培地を10mlのFCSぬきのDMEMに交換し、さらに48時間培養し培養液を回収した。

【0069】(3) pSV2TMD7、pSV2TMD8により形質転換されたCOS-1細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性の測定

pSV2TMD7あるいは、pSV2TMD8により形質転換されたCOS-1細胞の培養上清5 μ l、トロン

ビン(シグマ社、カタログ番号T-6759、20ng/ μ l) 3 μ l、10×アッセイ緩衝液(1M NaCl、30mM CaCl₂、1%牛血清アルブミン含有、0.5M トリス塩酸緩衝液 pH8.5) 5 μ l、及び蒸留水29.5 μ lを混合し、37℃で5分間放置後、プロテインC(牛由来、0.2 μ g/ μ l) 7.5 μ lを加え、37℃で30分間反応させた。反応は、ストップ液(100mM NaCl、0.3A₂₈₀アンチトロンビンIII、100 μ g/mlヘパリン含有20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5))を6.25 μ l加えることにより止めた。

【0070】活性化プロテインCの活性は、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA(ペプチド研究所、5mg/ml) 10 μ l、5M CsCl 5 μ l

基質反応緩衝液(100mM NaCl含有50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.5)) 495 μ lを加え、37℃、20分間反応させ、酢酸55 μ lを加え反応を止めた後、遊離したAMC(7-アミノ-7-メチル-クマリン)濃度を励起波長380nm、発光波長440nmで蛍光分光光度計(島津製作所 RF-540)により測定した。得られた蛍光強度を既知濃度のAMCの蛍光強度と比較して、遊離したAMC量を求めた。このAMC量から本発明のペプチドを含まない水溶液を加えた時のAMC量を差し引いた値がサンプルのトロンビンによるプロテインC活性化を促進する強さを現わす。1分間に反応液1mlあたり1nMの活性化プロテインCを生成する活性を1uとした。結果を表1に示す。

【0071】(4) pSV2TMD7、pSV2TMD8により形質転換されたCOS-1細胞の産生するペプチドの定量

pSV2TMD7、pSV2TMD8によりそれぞれ形質転換されたCOS-1細胞の培養上清に含まれるペプチドの量は、K. Suzukiら[J. Biol. Chem. 264. 4872-4876 (1989)]の方法に従いウサギ抗ヒトロンボモジュリン抗体を用いたエンザイムイムノアッセイ(以下ELISAと略す。)により定量した。詳しくは次に述べる。

【0072】(a) プラスミドpSV2TMD1の構築部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd3の代わりに、下記の塩基配列: 5'-GGAGGCCGCTCAGCCCGAATGCACG-3' (25mer)を有するディリーターTMd1を用いる以外は上記実施例1-(1)-(a)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13TMJ3の一部を削除して、177塩基の削除を行い、TMD1と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMD1を得た。このTMD1は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目のアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第4図に組換え体プラスミドM13mp19

TMJ3とディリーターTMd1がハイブリダイズしてDNA断片TMJ3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。更にこの組換え体プラスミドM13TMD1のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMD1の約1700bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bp DNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMD1を得た。

【0073】(b) プラスミドpSV2TMD1の動物細胞への導入、ペプチドの精製

上述の実施例1-(4)-(a)で構築したプラスミドpSV2TMD1と、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC番号37146)をF. L. Grahamらの方法[F. L. Graham Virology 52, 456 (1973)]に従い、リン酸カルシウム法によりCHO-dhfr⁻細胞株にトランスフェクションを行った。なおCHO-dhfr⁻細胞株はコロンビア大学Dr. L. Chasi, Dr. G. U. Chasin. より入手した。細胞培養はダルベッコの最小必須培地(DMEM、フロー社)にブロリンが150 μ g/ml、透析牛胎児血清(DFCS、ギブコ社、カタログ番号220-6440AG)、が10%となるように加えたものを使用した。約1ヶ月後に細胞のコロニーが出現した。各々の細胞をメントレキセート(MTX、和光純薬)濃度が、20nM、200nM、2 μ M、20 μ Mとなるように順次増加させていき、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチドの高生産株(9G5E)を樹立した。この細胞を同培地で増殖させ、同培地の血清濃度を1%に減少させた培地で培養し、。培養液101を得た。

【0074】次いで、この培養液101を0.2M NaCl含有 20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQセファロース(ファルマシア社17-0510-01)に活性画分を吸着させ、平衡化緩衝液で洗浄後、NaCl 1M含有20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で溶出させた後、この画分を20mMトリス緩衝液(pH7.4)で5倍に希釈した。次いで、N. L. Esmonら[J. Biol. Chem. 257-859 (1982)]の方法に従って作製したジソプロピルフォスフォロートロンビンを、P. Cuatrecasas[J. Biol. Chem. 245-3059 (1970)]の方法にしたがってブロムシアン化したアガロースに結合させて作製したジソプロピルフォスフォロートロンビンアガロースカラム(以下DIP-ートロンビンカラムと称する。)を0.2M NaCl含有 20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化し、この画分を通し、活性画分を吸着させ平衡化に用いた緩衝液で洗浄後、1.0M NaCl含有20mMリ

ン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶出することにより活性画分を得た。更に得られた活性画分を濃縮後、リン酸緩衝液塩化ナトリウム (PBS) で平衡化したセファクリル S-300 (ファルマシア社 17-0559-01) カラムに供し、同緩衝液で展開し、活性画分を得た後、濃縮を行った。このように精製したペプチドを D123A_{sp} とした。

[0075] (c) 抗体の作製

前述のように精製したペプチド D123A_{sp} に対する抗体は、成書 E. Harlow ら [Antibodies A Laboratory Manual 192 (1988) Cold Spring Harbor Laboratory] に従ってウサギ (日本白色種系、生後4ヶ月) に免疫し、抗血清を調製した後、更に、硫酸沈殿により精製した。

[0076] この抗体がペプチド D123A_{sp} と反応することは、以下のように確認した。即ち、前述の実施例 1-(4)-(b) で得た精製ペプチドの約 10 ng をニトロセルロースフィルターにスポットする。よく風乾した後、この抗体を用い 1 次抗体としてニトロセルロースフィルター上のペプチドと反応させ、次いでヤギで調製したビオチン化抗ウサギ IgG (ザイメッドラボラリー 62-1840) を 2 次抗体として反応させた後、アビチン及びビオチン化した西洋ワサビ由来パーオキシダーゼ (アマーシャムジャパン RPN1051) を反応させ、さらに基質 (チーククロマトール) を作用させる方法で発色させると黒褐色のスポットが検出された。

[0077] (d) ELISA

ペプチドの量は、K. Suzuki ら [J. Biol. Chem, 264, 4872-4876 (1989)] の方法に従いウサギ抗ヒトロンボモジュリン抗体を用いた ELISA により定量した。即ち、前述の実施例 1-(4)-(c) で調製したウサギ抗ヒトロンボモジュリン抗体を E. Harlow ら [Antibodies A Laboratory Manual 630 (1988) Cold Spring Harbor Laboratory] に従い F(ab')₂ 化した抗体を 0.1 M 重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.2) で 5 µg/ml となるように希釈し、100 µl/穴となるように 96 穴のマイクロタイタープレート (ダイナテック社、カタログ番号 011-010-7801) に分注する。1 時間後、プレートの穴を 0.1 M 重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.2) で洗浄し、その後 10% 正常ウサギ血清 (フロー社 カタログ番号 29-411-49) を 200 µl/穴となるように入れ 2 時間ブロッキングを行う。次いで洗浄液 [0.1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 0.05% Tween-20 含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)] で洗浄後、測定するペプチドの溶液を 0.1% B

SA, 0.5%ゼラチン, 0.05% Tween-20 含有、PBS で 100 倍から 100000 倍まで 10 倍ごとに希釈した後、100 µl ずつ各穴に入れ 2 時間反応させる。次いで上記洗浄液で洗浄後、前述の F(ab')₂ 化した抗ヒトロンボモジュリン抗体を S. Yoshitake ら [Scand. J. Immunol. 10, 81-86, (1979)] の方法に従い、β-ガラクトシダーゼで標識した抗体液 (1 µg/ml) を 100 µl/穴となるように入れ、1 時間反応させる。上記洗浄液で洗浄後、0.1 mg/ml の濃度で PBS に溶解した 4-MUG (4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトシド シグマ社 カタログ番号 M-1633) の液を 100 µl/穴となるように入れた。蛍光の測定は 360 nm の励起波長、450 nm の測定波長で 96 穴プレート用蛍光分光光度計 (ハンデックス社 カタログ番号 10-015-1) を用い測定した。結果は表 1 に示す。

[0078] (5) Asp³⁶⁷ の変異体の作製

(a) プラスミド pSV2TMM1 の構築

- 20 部位特異的変異の手法を用いてディリーター TMd3 の代わりに、下記の塩基配列: 5'-CTGAAGCACGGAGCCACGGGCTCCA-3' (25 mer) を有する変異用 DNA プローブ (以下、"ミューテーター" と称する。) TMM1 を用いる以外は上記実施例 1-(1)-(a) と実質的に同様の方法で、実施例 1-(4)-(a) で得られた組換え体プラスミド M13TMD1 の一部を改変して、Asp³⁶⁷ の Ala への変換を行い、TMM1 と称する DNA 断片を含む組換え体プラスミド M13TMM1 を得た。この TMM1
- 30 は、配列表の開始コドン (ATG) から 516 番目までのアミノ酸からなるが、367 番目の Asp が Ala に変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第 5 図に組換え体プラスミド M13TMD1 とミューテーター TMM1 がハイブリダイズして Asp³⁶⁷ が、Ala³⁶⁷ に変換されているところを示す。更に、この組換え体プラスミド M13TMM1 の DNA を HindIII 及び BamHI で完全消化して、TMM1 の約 1700 bp DNA 断片を単離した。一方プラスミド pSV2-dhfr (ATCC 3
- 40 7146) を HindIII 及び BglII で完全消化してベクターを得、このベクターと上記 1700 bp DNA 断片とを T4 DNA リガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミド pSV2TMM1 を得た。

[0079] (b) プラスミド pSV2TMM2 の構築
部位特異的変異の手法を用いてディリーター TMd3 の代わりに、下記の塩基配列: 5'-CTGAAGCACGGTTCACGGGCTCCA-3' (25 mer) を有するミューテーター TMM2 を用いる以外は上記実施例 1-(1)-(a) と実質的に同様の方法で、

50 実施例 1-(4)-(a) で得られた組換え体プラスミ

DM13TMD1の一部を改変して、Asp³⁶⁷のGluへの変換を行い、TMM2と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMM2を得た。このTMM2は、配列表の開始コドン(ATG)から516番目までのアミノ酸からなるが、367番目のAspがGluに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第6図に組換え体プラスミドM13TMD1とミューテーターTMm2がハイブリダイズしてAsp³⁶⁷が、Glu³⁶⁷に変換されているところを示す。更に、この組換え体プラスミドM13TMM2のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMM2の約1700bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記1700bp DNA断片とをT4 DNAリガーゼを用いてつなぎ合わせ、プラスミドpSV2TMM2を得た。

【0080】(c) Asp³⁶⁷の変異体のCOS-1細胞へのトランスフェクション

pSV2TMD1, pSV2TMM1, pSV2TMM2のCOS-1細胞へのトランスフェクションは、前述の実施例1-(2)の方法に従った。それぞれのプラスミドについて、90回のエレクトロポレーションを行い、培養液をそれぞれ約900ml得た。

【0081】(d) Asp³⁶⁷の変異体のペプチドの精製、定量

前述の実施例1-(5)-(c)で得られた培養液900mlを5mM リン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQセファロースカラム(ファルマシア社カタログ番号17-0510-01)に吸着させ、0.18M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄後、0.28M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出させた。次いで、この画分をChelex100(パイオラッド社 カタログ番号143-2832)を使用してCaイオンを除去した5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で透析した。次いで、上記実施例1-(4)に記載のELISAによりそれぞれのペプチドの定量を行った。その結果それぞれのペプチド約50μgが得られた。また、pSV2TMM1により形質転換されたCOS-1細胞の培養上清より精製されたペプチドD123Ala, pSV2TMM2により形質転換されたCOS-1細胞の培養上清より精製されたペプチドD123Gluと称した。

【0082】(e) Asp³⁶⁷の変異体のペプチドのトロニンによるプロテインCの活性化を促進する活性の測定

前述の実施例1-(5)-(d)において精製、定量したペプチドの溶液(0.4μg/ml)について、前述の実施例1-(3)の方法に従いトロニンによるプロテインCの活性化を促進する活性を測定した。但し、1

0×アッセイ緩衝液の中のCaCl₂の濃度を調製し、0-5mMのカルシウムイオン濃度における活性測定を行った。また、プロテインCの代わりにN. L. Esmon [J. Biol. Chem 258 5548-5553 (1983)]の方法に従い、キモトリプシン処理により調製したGladメインなしのプロテインC(以下GDPCと称する。)を用いた場合についても同様のカルシウムイオン濃度範囲での活性測定を行った。結果を図7-9に示す。

10 【0083】D123Aspは、プロテインCの活性化の際には、0.4-0.5mMのカルシウムイオン濃度において極大値を示す高い活性が検出された、GDPCの活性化の際には、そのような特徴的なカルシウムイオン濃度依存性はみられず、全体的に低い活性が検出された。

【0084】D123Alaについては、プロテインC、GDPCいずれの場合にも低い活性が検出された。D123Gluについては、D123Aspと同様の活性を示したが、プロテインCの活性化の際にはD123Aspに比べ1.2倍の高い活性を示した。

20 【0085】実施例2

ヒトトロノモジュリンのトロニンとの結合部位を含むアミノ酸配列の同定

(1) 合成ペプチドの作製

ペプチドの合成は、フェニルアセトメチル樹脂(PAM樹脂)を支持体とし、ペプチド自動合成機(アプライドバイオシステムズ モデル431A)を用いた固相合成法により、ヒトトロノモジュリンの406番目から444番目のアミノ酸配列を参考に、以下の3種類のペプチドを合成した。

30 ペプチドA: Met-Phe-Cys-Asn-Gln-Thr-Ala-Ala-Pro-Ala-Asp-Cys-Asp

ペプチドB: Ala-Cys-Pro-Ala-Asp-Ala-Asp-Pro-Asn-Thr-Gln-Ala-Ser-Cys-Glu

40 ペプチドC: Glu-Cys-Pro-Glu-Gly-Tyr-Ile-Leu-Asp-Asp-Gly-Phe-Ile-Cys-Thr-Asp-Ile-Asp-Glu

まず、ペプチドAの場合は、PAM樹脂にt-butyl oxycarbonyl-aspartic acid β-benzyl esterを結合させたPAM-アスパラギン酸樹脂(アプライドバイオシステム、カタログ番号400092)を出発原料とし、逐次C末端側Boc-Cys(4-CH₃OBzl)、Boc-Asp(OBzl)と常法に従って保護アミノ酸を1個ずつ結合させた。ペプチドB及びCについては、PAM樹脂にt-butyl oxycarbonyl glutamic acid γ-benzyl esterを

結合させたPAM-グルタミン酸樹脂(アブライドバイオシステム、カタログ番号400096)を出発原料とし、逐次C末端側から保護アミノ酸を結合させた。なお、保護アミノ酸は次のものを用いた。

t-butylloxycarbonyl-L-alanine (Boc-Ala), t-butylloxycarbonyl-L-asparatic acid β -benzyl ester (Boc-Asp (OBzl)), t-butylloxycarbonyl-L-glutamic acid γ -benzyl ester (Boc-Glu (OBzl)), t-butylloxycarbonyl-S-p-methoxybenzyl-L-cysteine (Boc-Cys (4-CH₃OBzl)), t-butylloxycarbonyl-L-Phenylalanine (Boc-Phe), t-butylloxycarbonyl-L-Asparagine (Boc-Asn), t-butylloxycarbonyl-L-Glutamine (Boc-Gln), t-butylloxycarbonyl-L-Proline (Boc-Pro), t-butylloxycarbonyl-O-benzyl-L-Threonine (Boc-Thr (Bzl)), t-butylloxycarbonyl-O-benzyl-L-Serine (Boc-Ser (bz1)), t-butylloxycarbonyl-O-2-bromobenzylloxycarbonyl-L-Tyrosine (Boc-Tyr (BrBzl)), t-butylloxycarbonyl-glycine (Boc-Gly), t-butylloxycarbonyl-L-Isoleucine (Boc-Ile), t-butylloxycarbonyl-L-leucine (Boc-Leu)

このようにして得られた保護ペプチドの結合した樹脂(1g)をフッ化水素反応容器に入れ、アニソール(0.5ml)を加え浸透させた。そして、フッ化水素10mlを加え、0℃、1時間反応させた後、直ちにフッ化水素1を留去した。残りに1%酢酸を加えペプチドを抽出し、溶液をエーテルで洗った後、凍結乾燥することにより粗ペプチドを得た。

【0086】(2) 合成ペプチドの環状化、精製
前述の実施例2-(1)で合成したペプチドは、J. R. Ryan [J. Biol. Chem. 264: 20283-20287 (1989)]の方法に従い分子内のジスルフィド結合の形成、及び精製を行った。即ち、合成したペプチドをHPLCで精製し、アミノ酸分析で正しく合成されていることを確認後、100 μ g/mlの濃度になるように、8M尿素含有0.18mM K₃Fe(CN)₆液に溶解した。次いで、このペプチド溶液を室温で、12日間攪拌し環状化した。環状化の確認は、分析用のHPLCにより確認した。この混合物にpH

2.5になるまでトリフルオロ酢酸(40%)を加え、Waters Bondapak; カラム(1.9 \times 30cm)により精製し、減圧下で乾燥し、目的とする合成ペプチドを30mg得た。これらの合成ペプチドは、HPLCによる分析では、99%以上の純度であり、それらのアミノ酸配列は、実施例2-(1)に示したそれぞれのアミノ酸配列に相当するペプチドであることが確認できた。

- 【0087】(3) 合成ペプチドによるトロンビンのトロンボモジュリンへの結合の阻害作用の測定
トロンビンのトロンボモジュリンへの結合に対する合成ペプチドの阻害作用は、次のような方法で調べた。前述の実施例1-(4)-(b)で精製したD123Aspを0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.2)で1.5 μ g/mlとなるように希釈し、100 μ l/穴となるように96穴の平底ELISA用マイクロタイタープレートに分注する。3時間後、プレートの穴を0.1M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.2)で洗浄し、その後0.1M NaCl, 1%BSA含有50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を150 μ l/穴となるように入れ2時間ブロッキングを行う。次いで洗浄液(0.5%BSA, 0.05%Tween-20含有50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で希釈したトロンビン(0-0.4 μ g/ml)と様々な濃度の合成ペプチド溶液とを37℃、30分反応させた溶液を加え、室温1時間反応させる。上記洗浄液で洗浄後、0.1M NaCl含有50mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に200 μ Mの濃度で溶解したH-D-Phe-Pip-Arg-pNA(カビ社 S2238)を100 μ l/穴で加えた。数時間の反応後遊離したpNA(パラニトロアニリン)を410nmの測定波長で測定した。ペプチド非添加時のトロンビンの活性を100%とし、それに対して各濃度のペプチドを添加した際のトロンビンの活性の割合を%で表した値をVとする。100/Vを縦軸に、ペプチドの濃度を横軸に取りグラフをかき(ディクソンプロット)横軸との交点から、K_iの濃度を求めた。結果は表2に示す。

- 【0088】実施例3
新規なトロンビンによるプロテインCの活性化を促進するペプチドの作製

- (1) プラスミドpSV2TMM3の構築
部位特異的変異の手法を用いてディリーターTMd3の代わりに、下記の塩基配列: 5'-GAAGCACGGTTCGGGGAACCCAGG-3' (25mer)を有するミューテーターTMm3を用いる以外は前述の実施例1-(1)-(a)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7の一部を改変して、TMM3と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMM3を得た。このTMM3は、配列表の開始コドン(AT

G) から18番目のアミノ酸、及び、367番目から480番目までのアミノ酸からなるが、367番目のAspがGluに変換されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。図10に組換え体プラスミドM13TMD7とミューテーターTMm3がハイブリダイズしてAspが、Gluに変換されているところを示す。更に、この組換え体プラスミドM13TMM3のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMM3の約580bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr (ATCC 37146) をHindIII及びBglIIで完全に消化してベクターを得、このベクターと上記580bp DNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMM3を得た。

【0089】(2) プラスミドpSV2TMD7, pSV2TMM3のCOS-1細胞へのトランスフェクション

pSV2TMD7, pSV2TMM3のCOS-1細胞へのトランスフェクションは、前述の実施例1-(2)の方法に従った。それぞれのプラスミドについて、90回のエレクトロポレーションを行い、培養液をそれぞれ約900ml得た。

【0090】(3) プラスミドpSV2TMD7, pSV2TMM3でトランスフェクションしたCOS-1細胞の産生するペプチドの精製、定量

前述の実施例3-(2)で得られた培養液900mlを5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQセファロースカラムに吸着させ、0.15M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄後、1.0M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出させた。次いで、この画分を透析により脱塩を行った。次いで、0.2M NaCl含有20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したDIP-トロンビンカラムに、この画分を通し、活性画分を吸着させ平衡化するのに用いた緩衝液で洗浄後、1.0M NaCl含有20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出することによりこの活性画分を得た。次いで、この画分を再度0.2M NaCl含有20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したDIP-トロンビンカラムに通し、活性画分を吸着させ平衡化するのに用いた緩衝液で洗浄後、1.0M NaCl含有20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出することにより活性画分を得た。

【0091】ついで、この画分をChelex100(バイオラッド社 カタログ番号143-2832)を使用してCaイオンを除去した5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で透析した後セントリコン(アミコン カタログ番号4205)を用い濃縮を行った。次いで、上述の実施例1-(4)-(d)に記載のELISAによりそれぞれのペプチドの定量を行った。その結果、それぞれ50μgのペプチドが得られた。pSV2TMD7をトラ

ンスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE456Asp, pSV2TMM3をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE456Gluと称した。

【0092】(4) E456Asp, E456GluのトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する活性の測定

前述の実施例3-(3)において精製、定量したペプチドについて、前述の実施例1-(3)の方法に従いトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する活性を測定した。結果を図11~12に示す。E456Aspについては、図11に示すように、プロテインCの活性化の際には、0.4-0.5mMのカルシウムイオン濃度において極大地を示す高い活性が検出された。GDPCの活性化の際には、こうした特徴的なカルシウムイオン濃度依存性はみられず、全体的に低い活性が検出された。E456Gluについては、図12に示すように、E456Aspの場合と同様の活性を示したが、プロテインCの活性化の際にはE456Aspに比べ1.3倍の10 高い活性を示した。

【0093】実施例4

新規なトロンビンによるプロテインCの活性化を促進するペプチドの作製

(1) pSV2TMM4の構築

部位特異的変異の手法を用いてディリターTmd3の代わりに、下記の塩基配列：5'-GAAGCACGGGTCGTCGGGGAACCCAGG-3' (28mer)を有するミューテーターTMm4を用いる以外は前述の実施例1-(1)-(a)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7の一部に3塩基の挿入を行い、TMM4と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMM4を得た。このTMM4は、配列表の開始コドン(ATG)から18番目のアミノ酸、及び367番目から480番目のアミノ酸からなるが、367番目のAspの前に更にもう1個Aspが挿入付加されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。図13に組換え体プラスミドM13TMD7とミューテーターTMm4がハイブリダイズして3塩基の40 挿入が行われているところを示す。更に、この組換え体プラスミドM13TMM4のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMM4の約580bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記580bp DNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMM4を得た。

【0094】(2) pSV2TMM5の構築

50 部位特異的変異の手法を用いてディリターTmd3の

代わりに、下記の塩基列：5' -GAAGCACGGGTCGTCGTCGGGGAACCCACAGG-3'

(31mer)を有するミューテーターTMM5を用いる以外は前述の実施例1-(1)-(a)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7の一部に6塩基の挿入を行い、TMM5と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMM5を得た。このTMM5は、配列表の開始コドン(ATG)から18番目のアミノ酸、及び367番目から480番目のアミノ酸からなるが、367番目のAspの前に更にもう2個Aspが挿入付加されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。図14に組換え体プラスミドM13TMD7とミューテーターTMM5がハイブリダイズして6塩基の挿入が行われているところを示す。更に、この組換え体プラスミドM13TMM5のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMM5の約580bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記580bp DNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMM5を得た。

[0095] (3) pSV2TMM6の構築

部位特異的変異の手法を用いてディリターTMd3の代わりに、下記の塩基配列：5' -GAAGCACGGGTCTTCGGGGAACCCACAGG-3' (28mer)を有するミューテーターTMM6を用いる以外は前述の実施例1-(1)-(a)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7の一部に3塩基の挿入を行い、TMM6と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMM6を得た。このTMM6は、配列表の開始コドン(ATG)から18番目のアミノ酸、及び367番目から480番目までのアミノ酸からなるが、367番目のAspの前に1個Gluが挿入付加されているペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。図15に組換え体プラスミドM13TMD7とミューテーターTMM6がハイブリダイズして3塩基の挿入が行われているところを示す。更に、この組換え体プラスミドM13TMM6のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMM4の約580bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記580bp DNA断片とをT4DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMM6を得た。

[0096] (4) COS-1細胞へのトランスフェクション

実施例1、3及び上記工程で得られたプラスミドpSV

2TMD7, pSV2TMM3, pSV2TMM4, pSV2TMM5, pSV2TMM6について実施例1-(2)の方法に従いCOS-1細胞へのトランスフェクションを行った。90回のエレクトロポレーションを行い、培養液をそれぞれ約900ml得た。

[0097] (5) ペプチドの精製、定量

前述の実施例4-(4)で得られた培養液900mlについて、実施例3-(3)の方法に従い精製を行った。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならぬ10.0 ($E^{1\%1cm} \cdot 280nm = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を測定したところそれぞれ約50μgであった。尚、精製品をボリアクリルアミドゲル濃度15-25%のグラジエントを用いるSDS-ボリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、CBB染色を行いバンドを観察したところ単一のバンドのみ観察された。pSV2TMD7をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE456Asp, pSV2TMM3をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE456Glu, pSV2TMM4をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE456Asp2, pSV2TMM5をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE456Asp3, pSV2TMM6をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE456GluAspと称した。

[0098] (6) プロテインCの活性化を促進する活性の測定

前述の実施例4-(5)において精製、定量したペプチドについて、次の方法でトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する活性を測定した。

[0099] 即ち、0.1M NaCl, 0.5mM CaCl₂, 10mg/ml BSAを含む0.02M トリス塩酸緩衝液(pH8.5)に50μg/mlのプロテインC, 5nMのトロンビン, 5nMの精製した本発明のペプチドを加え37℃で反応させた。反応物は300μg/mlのアンチトロンビンIII及び5mMEDTAを加え反応を停止し、生成した活性型プロテインCの量を前述の実施例1-(3)記載の合成基質を用いる方法で測定した。結果を図16, 17, 18, 19, 20に示すが、本発明のペプチドを無添加の場合(点線)では、活性化プロテインCの生成は認められなかったが、本発明のペプチドを添加した場合には、反応時間と共に生成した活性化プロテインCの量が増加した。

[0100] (7) 抗血液凝固作用の測定

本発明のペプチドがトロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの転換を阻害し、血液凝固を実質的に阻害することは、コアギュロメーター(アメルング社、KC10A)を用いて血液凝固時間を測定することによ

て調べた。即ち、5mM CaCl₂, 0.1M Na

Clを含む0.05Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)に3.0 μ gのフィブリノーゲン(シグマ社、フラクシオンI)を加えこれに0-50nMの精製した本発明のペプチドを加え、ついで全量が0.4mlになるように10nMのトロンピンを加え凝固時間を測定した。結果を図21, 22, 23, 24, 25に示す。トロンピンに比べ、添加した精製ペプチドの量が多くなるにしたがって血液凝固時間の延長が確認された。

【0101】(8)血小板凝集抑制作用の確認

本発明のペプチドがトロンピンの血小板凝集作用を実質的に阻害することは、血小板凝集測定装置(NBS社ヘマトレーサーIV)を用いて評価した。測定操作は、ヘマトレーサー付属のマニュアルに従った。即ち、3 \times 10⁵ cells/ μ lの血小板溶液(Platelet Rich Plasma, PRP)180 μ lに20NIH unit/mlのトロンピン溶液(シグマ社、T6759)を40 μ l加えると血小板が凝集するが、40NIH unit/mlのトロンピン溶液20 μ lに対してトロンピンに対して等モル以上の精製した本発明のペプチドを含む溶液20 μ lを事前に混合して2分間、37℃で保温した後に加えると血小板の凝集は起きなかった。トロンピンあるいはトロンピンとペプチドの混合物をPRPに加えた時間を0分とした。また血小板凝集はPPP(Platelet Poor Plasma)の透過度を100%として測定した。結果を図26, 27, 28, 29, 30に示す。本発明のペプチドを添加した場合、血小板の凝集が抑制されることが確認された。

【0102】実施例5

E456Gluのプロトロンビンリーダーペプチドを用いた発現

(1)プラスミドpSV2PTTMM3の構築

図31に示される行程に従って、E456Gluをコードする遺伝子をプロトロンビンのリーダーペプチドを用いて発現させる為のプラスミドpSV2PTTMM3を構築した。

【0103】(a)PTTMリンカーの作製

E456Gluをコードする遺伝子をSV40のプロモーターの支配下にプロトロンビンリーダーペプチドを用いて発現させるために、図31中に示す配列を有するPTTMリンカーを作製した。作製の詳細は以下に示すとおりである。

【0104】先ず、次の配列を有する4種のオリゴヌクレオチド：

①5'-AGCTTAGCTGACACACTATGGCGCACGTCCGAGGCTTGCAGCTGCC TGGCTGCCTGGCCCTGGCTGCCCTGTGT-3'

②5'-AGCCTTGTGCACAGCCAGCATGTGTTCCCTGGCTCCTCAGCAAGCAC

GGTCGCTGCTCGAGCGGGTCCGGCGACCCGTGGAA-3'

③5'-GTGCACAAGGCTACACAGGGCAGCCAGGGCCAGGCAGCCAGGCAGCTGCAAGCCTCGGACGTGCGCCATAGTGTGTCAGCTA-3'

④5'-TCCACGGGGTTCGCCGGACCCGCTCGAGCAGCGACCGTGCTTGCTGAGGAGCCAGGAACACATGCTGGCT-

10 3'をDNA合成機(アプライドバイオシステム社のDNAシンセサイザー、モデル380-A)を用いて常法どおり合成した。次いで、上記オリゴヌクレオチド②、③の5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、上記オリゴヌクレオチド①、④と混合しアニーリングすることによりPTTMリンカーを得た。

【0105】(b)pSV2PTTMM3の構築

まず、実施例1-(1)-(a)で作製したM13TMD3をAvaII, EcoRIで完全消化し、E456 Aspをコードする遺伝子を含有する約520bpのAvaII-EcoRI断片を分離、精製した。さらに、この520bpのDNA断片をMung Bean Nuclease(宝酒造、2420A)を用いて末端を平滑化した後BamHIで消化し、約520bpの断片を得た。一方、pSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化しベクターを得た。次いで、このベクターと上記520bp DNA及び実施例5-(1)-(a)で作製したPTTMリンカーをT4リガーゼを用いて連結することにより pSV2PTTMM3を得た。

【0106】(2)プラスミドpSV2PTTMM6の構築

図32に示される行程に従って、E456GluAspをコードする遺伝子をプロトロンビンのリーダーペプチドを用いて発現させる為のプラスミドpSV2PTTM6を構築した。

【0107】(a)PTTM2リンカーの作製

E456GluAspをコードする遺伝子をSV40のプロモーターの支配下にプロトロンビンリーダーペプチドを用いて発現させるために、図32に示す配列を有するPTTM2リンカーを作製した。作製の詳細は以下に示すとおりである。先ず、次の配列を有する4種のオリゴヌクレオチド；

①5'-AGCTTAGCTGACACACTATGGCGCACGTCCGAGGCTTGCAGCTGCC TGGCTGCCTGGCCCTGGCTGCCCTGTGT-3'

②5'-AGCCTTGTGCACAGCCAGCATGTGTTCCCTGGCTCCTCAGCAAGCAC 50 GGTCGCTGCTCGAGCGGGTCCGGCG

ACCCGTGGAAGAC-3'

③ 5'-GTGCACAAGGCTACACAGGGC
AGCCAGGGCCAGGCAGCCAGGCAGC
TGCAAGCCTCGGACGTGCGCCATAG
TGTGTCAGCTA-3'

④ 5'-GTCTTCCACGGGTCGCCGGAC
CCGCTCGAGCAGCGACGTGCTTGCT
GAGGAGCCAGGAACACATGCTGGCT
-3'

をDNA合成機（アプライドバイオシステム社のDNA
シンセサイザー、モデル380-A）を用いて常法にど
おり合成した。次いで、上記オリゴヌクレオチド②、③
の5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン
酸化した後、上記オリゴヌクレオチド①、④と混合シア
ニリングすることによりPTTM2リンカーを得た。

【0108】(b) pSV2PTTMM6の構築

まず、実施例1-(1)-(a)で作製したM13TM
D3をAvaII, EcoRIで完全消化し、E456
Aspをコードする遺伝子を含有する約520bpのA
vaII-EcoRI断片を分離、精製した。さらに、
この520bpのDNA断片をMung Bean N
uclease（宝酒造、2420A）を用いて末端を
平滑化した後BamHIで消化し、約520bpの断片
を得た。一方、pSV2-dhfr（ATCC 371
46）をHindIII及びBglIIで完全消化しベ
クターを得た。次いで、このベクターと上記520bp
DNA及び実施例5-(2)-(a)で作製したPTT
M2リンカーをT4リガーゼを用いて連結することによ
りpSV2PTTMM6を得た。

【0109】(3) プラスミドpSV2PTTMM3,
pSV2PTTMM6のCHO細胞へのトランスフェク
ション

pSV2PTTMM3のCHO細胞へのトランスフェク
ションは、前述の実施例1-(4)-(b)の方法に従
った。1ヶ月後に細胞のコロニーが出現した。各々の細
胞をメントレキセート（MTX、和光純薬）濃度が、2
0nM、200nMとなるように順次増加させていき、
トロニンによるプロテインCの活性化を促進する作用
を有するペプチドの高生産株（PTTM）を樹立した。
この細胞を150μg/mlプロリン、10%（v/
v）DFCS、5μg/mlビタミンK₁（Aquam
ephyton, Merck Sharp and D
ohome社）含有のDMEM培地で増殖させ、培地の
血清濃度を1%に減少させた同培地で培養し、培養液1
1を得た。

【0110】pSV2PTTMM6についても同様にC
HO細胞への導入を行い、高生産株（PTTM2）を樹
立し、培養液11を得た。

【0111】(4) ペプチドの精製、定量

前述の実施例5-(3)で得られたPTTM, PTTM

2の培養液11をそれぞれ、実施例3-(3)の方法
に従い精製した。精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白
質の分子吸光係数にならない10.0 ($E^{1\%}_{1cm} \cdot 280nm = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品
の量を計算したところそれぞれ約50μgであった。

尚、精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5-10%の
グラジエントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル
電気泳動を行い、CBB染色を行いバンドを観察したと
ころ単一のバンドのみ観察された。PTTM細胞の培養
10 液から精製されたペプチドをE456Glaと称した。
PTTM2細胞の培養液から精製されたペプチドをE4
56GlaAspと称した。

【0112】(5) トロニンによるプロテインCの活
性化を促進する活性の測定

前述の実施例3-(3)で精製したペプチドE456G
luについて、分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸
光係数にならない10.0 ($E^{1\%}_{1cm} \cdot 280nm = 10.0$)と規定して、それに基づき精製したペプチド
の量を計算した。さらに、このE456Glu及び実施
20 例5-(4)において精製、定量したペプチドE456
Gla, E456GlaAspについて、前述の実施例
4-(6)の方法に従いトロニンによるプロテインC
の活性化を促進する活性を測定した。

【0113】E456Gla及び、E456Gluにつ
いての結果を図33, 34に、E456GlaAspに
ついての結果を図35に示すが、本発明のペプチドを無
添加の場合（点線）では、活性化プロテインCの生成は
認められなかったが、本発明のペプチドE456G
lu, E456GlaAspまたはE456Gluを添加
30 した場合には、反応時間と共に生成した活性化プロテ
インCの量が増加した。E456Glaの方がE456G
luに比べ生成した活性化プロテインCの量が30分の
時点で20%多かった。また、E456GlaAspの
方がE456Gluに比べ生成した活性化プロテインC
の量が30分の時点で80%多かった。

【0114】(6) γカルボキシグルタミン酸の確認

(a) N末端アミノ酸配列の決定

上記行程により精製したE456Gla及びE456G
luAspを、それぞれ0.1%（v/v）SDS水溶
40 液で室温で16時間透析してアミノ酸配列分析用試料と
した。次いで、アミノ酸シーケンサー（アプライドバ
イオシステムモデル470A）を用い、R. M. Hew
ickらの方法〔J. Biol. Chem, 256, 7
990 (1981)〕に従い、N末端側より順次エドマ
ン分解を行った。遊離してくるフェニルチオヒダントイ
ン・アミノ酸をHPLC（スペクトロフィジック社、S
P8100）及びゾルバックODSカラム（デュボン
社）を用い分析を行い、アミノ酸配列を決定した。その
結果E456Glaについては、下記のアミノ酸配列が
50 明らかになった。

Pro-Val-X-Pro-X-Phe-Arg-Ala-

また、E456GlaAspについては、下記のアミノ酸配列が明らかになった。

Pro-Val-X-Asp-Pro-X-Phe-Arg-Ala-

Xで示すサイクルでは、アミノ酸は検出できなかった。

【0115】(b) γ カルボキシグルタミン酸の確認
上記行程により精製したE456GlaE456GlaAspを、それぞれM. J. Jorgensenら

(J. Biol. Chem, 262, 14, 6729-6734 (1987))の方法に従いアミノ酸分析を行った。精製したペプチドを2M水酸化カリウム中で110℃、22時間加水分解し、データシステム(ベックマン、モデル126)付きのアミノ酸分析計(ベックマン、モデル119CL)を用いアミノ酸分析を行ったところ、両者について γ カルボキシグルタミン酸が認められた。

【0116】(7) 抗血液凝固作用の測定

本発明のペプチドがトロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの転換を阻害し、血液凝固を実質的に阻害することは、実施例4-(7)の方法に従い測定した。E456Glaについての結果を図36に、E456GlaAspについての結果を図37に示す。トロンビンに比べ、添加した精製ペプチドの量が多くなるにしたがって血液凝固時間の延長が確認された。

【0117】(8) 血小板凝集抑制作用の確認

本発明のペプチドがトロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害することは、実施例4-(8)の方法に従い測定した。E456Glaについての結果を図38に、E456GlaAspについての結果を図39に示す。本発明のペプチドを添加した場合血小板の凝集が抑制されることが確認された。

【0118】

【実施例6】E456Asp, E456Gluのアクレモニウム・クリソゲナムにおける発現

(1) プラスミドpMTMD7の構築

図40、41に示される行程に従って、E456Aspをコードする遺伝子をアクレモニウム・クリソゲナム由来のPGKプロモーター支配下に発現させるためのプラスミドpMTMD7を構築した。

【0119】(a) PGTMLリンカーの作製

E456Aspをコードする遺伝子の開始コドン(アクレモニウム・クリソゲナムPGK遺伝子の開始コドンの位置に正確に一致させるために、図40中に示す配列を有するPGTMLリンカーを作製した。作製の詳細は以下に示すとおりである。まず、次の配列を有する2種のオリゴヌクレオチド：

⑤5' -CGCGTCGATTTCACAGTCAAAATGCTTGGGGTCCTG-3'

⑥5' -GGACCAGGACCCCAAGCATTTTGACTGTGAATCGA-3'

を自動DNA合成機(アプライドバイオシステム社のDNAシンセサイザー、モデル380-A)を用いて常法どうり合成した。ついで、上記オリゴヌクレオチド⑤、⑥を混合しアニーリングすることによりPGTMLリンカーを得た。

【0120】(b) pUMPGTMD7の構築

まず、実施例1-(1)-(b)で作製したM13TMD7について、メチル化能マイナスの宿主を使用し2本鎖DNAを調製後、AvaII, XbaIで完全消化しN端コード域の一部を欠いたE456Aspをコードする遺伝子を含有する約540bpのAvaII-XbaI断片を分離、精製した。一方、UM20(IBM社カタログ番号33700)をMluI, XbaIで切断し約7.3KbのDNA断片を分離精製した。ついで、これら2種のDNA断片と上記行程で得られたPGTMLリンカーとをT4リガーゼを用いて連結することによりpUMPGTMD7を得た。

20 【0121】(c) pPGTMD7の構築

まず、上記行程で作製したpUMPGTMD7をMluI, PvuIIで完全消化し、PGK5'非コード域の一部及びE456Aspをコードする遺伝子を含む約510bpのMluI-PvuII断片を分離、精製した。一方、松田らの方法(特願平2-219032)に従い得られたアクレモニウム・クリソゲナム由来のPGKプロモーター、PGKターミネーターを含むプラスミドpPGACY2をMluI, NruIで切断し約4.8KbのDNA断片を分離精製した。ついで、これら230種のDNA断片をT4リガーゼを用いて連結することによりpPGTMD7を得た。

【0122】(d) pMTMD7の構築

上記行程で構築されたアクレモニウム・クリソゲナム由来PGKプロモーター、E456Aspをコードする遺伝子、アクレモニウム・クリソゲナム由来PGKターミネーターからなるE456Asp発現単位(E456Asp発現単位と称する。)を含むプラスミドpPGTMD7をSfiIで切断し、2.6KbのE456Asp発現単位を含むDNAフラグメントを分離精製した。一方、松田らの方法(特願平2-219032)に従い得られたプラスミドpBSFAHY83をSfiIで切断し、さらに、アルカリホスホターゼ処理を施した。ついで両者を、E456Asp発現単位のDNAフラグメント濃度が高い条件下でT4リガーゼで連結せしめ、E. coli HB101にトランスフォームした後、アンピシリン(100 μ g/ml)を含有するL-ブロス寒天培地上に広げ、37℃で一晩培養し、コロニーを形成させた。次いで、該コロニーからランダムに10個を選択し、その各々より組換えコスミドDNAを抽出し、BstEIIで切断した後、アガロースゲル電気泳動による50

解析を行い、その結果、ベクター1分子当たり多数のE456A_{sp}発現単位が挿入された組換え体コスミド1個を選択し、これをpMTMD7と命名し、大量に調製した。尚、上記の解析の結果からpMTMD7には、少なくとも5コピー以上のE456A_{sp}発現単位が含まれていると推定された。

【0123】(2) プラスミドpMTMM3の構築
図42、43に示される行程に従って、実質的には、実施例6-(1)に記載されたのと同様の方法で、E456Gluをコードする遺伝子をアクレモニウム・クリソゲナム由来のPGKプロモーター支配下に発現させるためのプラスミドpMTMM3を構築した。

【0124】(a) まず、実施例3-(1)で得られたM13TMM3をAvaI, XbaIで完全消化し、N端コード域の一部を欠いたE456Gluをコードする遺伝子を含有する約540bpのAvaI-XbaI断片を分離、精製した。一方、UM20(IBM社カタログ番号33700)をMluI, XbaIで切断し約7.3KbのDNA断片を分離精製した。ついで、これら2種のDNA断片と上記実施例6-(1)-

(a)で得られたPGTMリンカーとをT4リガーゼを用いて連結することによりpUMPGTMM3を得た。

【0125】(b) pPGTMM3の構築
まず、実施例6-(2)-(a)で作製したpUMPGTMM3をMluI, PvuIIで完全消化し、PGK5'非コード域を一部含むE456Gluをコードする遺伝子を含有する約510bpのMluI-PvuII断片を分離、精製した。一方、松田らの方法(特願平2-219032)に従い得られたアクレモニウム・クリソゲナム由来のPGKプロモーター、PGKターミネーターを含むプラスミドpPGACY2をMluI, NruIで切断し約4.8KbのDNA断片を分離精製した。ついで、これら2種のDNA断片をT4リガーゼを用いて連結することによりpPGTMM3を得た。

【0126】(c) pMTMM3の構築
実施例6-(2)-(b)で構築されたアクレモニウム・クリソゲナム由来PGKプロモーター、E456Gluをコードする遺伝子、アクレモニウム・クリソゲナム由来PGKターミネーターからなるE456Glu発現単位(E456Glu発現単位と称する。)を含むプラスミドpPGTMM3をSfiIで切断し、2.6KbのE456Glu発現単位を含むDNAフラグメントを分離精製した。一方、松田らの方法(特願平-219032)に従い得られたプラスミドpBSFAHY83をSfiIで切断し、さらに、アルカリホスターゼ処理を施した。ついで両者を、E456Glu発現単位のDNAフラグメント濃度が高い条件下でT4リガーゼで連結せしめ、E.coli HB101にトランスフォームした後、アンピシリン(100μg/ml)を含有するL-プロス寒天培地上に広げ、37℃で一晩培養し、コロ

ニーを形成させた。次いで、該コロニーからランダムに10個を選択し、その各々より組換えコスミドDNAを抽出し、BstEIIで切断した後、アガロースゲル電気泳動による解析を行い、その結果、ベクター1分子当たり多数のE456Glu発現単位が挿入された組換え体コスミド1個を選択し、これをpMTMM3と命名し、大量に調整した。尚、上記の解析の結果からpMTMM3には、少なくとも5コピー以上のE456Glu発現単位が含まれていると推定された。

10 【0127】(3) pMTMD7及びpMTMM3のアクレモニウム・クリソゲナムへの導入

(a) プロトプラストの調製

プロトプラストの調製に用いた培地バッファーは、以下の通りに調製した。CM培地：ショ糖20g/リン酸二水素カリウム0.5g/リン酸水素二カリウム0.5g/塩化カリウム0.5g/硫酸マグネシウム(7水塩)0.5g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.01g/硝酸ナトリウム3g/イーストエキストラクト4g/ペプトン10gを水1lに溶解したもの。

20 CM固形培地：1.5%の寒天を含有するCM培地。

GAG培地：グリセロール40g/アスパラギン4g/塩化カルシウム0.1g/塩化ナトリウム0.1g/微量金属溶液[硫酸マグネシウム(7水塩)4g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.4g/硫酸マンガン(4水塩)0.16g/硫酸亜鉛(7水塩)0.4g/無水硫酸銅0.04gを水1Lに溶解したもの]25ml/0.1Mリン酸バッファー(pH7.0)30mlを水1Lに含有する培地。

P-バッファー：0.6M塩化カリウム/0.01M塩

30 化マグネシウム/0.025M塩化カルシウム

CM固形培地上で30℃で5日間生育させたアクレモニウム・クリソゲナム(ATCC11550)の菌糸体をCM培地50mlに接種し、回転式振とう機(250r.p.m)上、30℃で3日間培養した。更に該菌液1mlを50mlのGAG培地に接種して、30℃で20時間培養した。得られた培養液50mlを3500r.p.mで10分間遠心し、菌糸体を沈澱させた後、0.9%のNaCl溶液で洗浄し、0.01Mジチオスレイトールを含んだマクイルバイン緩衝液(0.1Mクエン酸、0.2Mリン酸ナトリウム、pH7.3)20mlに懸濁し、30℃で1時間、おだやかに振とうした。次いで菌糸体を3200r.p.m10分間の遠心で沈澱させ、P-バッファーで洗浄した後、ノボザイム(Novo社)を10mg/mlの濃度で含有するP-バッファー10mlに懸濁し、30℃で1時間おだやかに振とうした。該反応液を800r.p.mで30秒間遠心して得た上清を、ろ紙(TOYO FILTER PAPER 5A)を用いて濾過する事により、菌糸体とプロトプラストを分離した。次いで該濾液を3000r.p.mで5分間遠心し、プロトプラストを沈澱させ

た後、P-バッファーで1回洗浄し、プロトプラストが $3 \times 10^8 / \text{ml}$ の濃度となるようにP-バッファーに懸濁した。

【0128】(b) pMTMD7及びpMTMM3によるプロトプラスト形質転換、及び培養

上記6-(3)-(a)で得たプロトプラスト懸濁液0.1mlに、pMTMD7とpMTMM35 μg ずつ含む溶液10 μl を加えた後、0.05mlのPEG溶液を加え、かるく混合した。該混合液を氷上に25分間静置した後、PEG溶液(25%ポリエチレングリコール(〜4000)/0.01Mトリス(pH8.0)/0.05M塩化カルシウム/0.6M塩化カリウム)を1ml加えて、室温で更に30分間静置した。かくして得られた形質転換プロトプラスト懸濁液を0.2mlずつプロトプラスト再生培地[文献(イソガイら: Agric. Biol. Chem. 1987, 51, 2321-2329)に記載されているBRM培地]を25ml含有するプレート上に広げ15℃で20時間培養した。次いで、該プレートに4.5mgのハイグロマイシンBを含み、50℃に保温した同様のBRM培地5mlを重ねした後、28℃で14日間培養した。その結果、ハイグロマイシンBに耐性となった形質転換体(以下、HYB形質転換体と称する。)がそれぞれ50株出現した。

【0129】(c) 形質転換体の培養上清のトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する活性の測定
このようにして得られたpMTMD7、pMTMM3によるHYB形質転換体を各々3株、CM培地30mlに接種し、30℃で3日間振とう培養した。(220r. p. m) 該培養液1mlを遠心分離にかけ(1500r. p. m, 5分) 上清を回収し、実施例1-(3)の方法にしたがってトロンビンによるプロテインCの活性化を促進する活性を測定したところ全ての株について活性が認められた。これに対して非転換株であるアクレモニウム・クリソゲナム(ATCC11550)には、全く該活性が検出されなかった。結果を表3に示す。

【0130】(4) E456A sp、E456G luの精製

以上のようにして得られた株D71とM31について各々、CM培地500mlに接種し、30℃で5日間振とう培養(220r. p. m)した。その後、培養液を遠心して上清を回収し、得られた培養上清500mlより実施例3-(3)の方法に従い本発明のペプチドを精製した。精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならない10.0($E^{1\%}_{1\text{cm}} \cdot 280\text{nm} = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところそれぞれ、約50 μg であった。尚、精製品をポリアクリルアミドゲル濃度15-25%のグラジエントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、CBB染色を行いバンドを観察したところ24Kと22Kの2本のバンドが観察された。

【0131】(5) トロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性の確認

上記行程において精製したE456A sp、E456G luの両ペプチドについて実施例4-(6)の方法に従いトロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性を促進した。結果を図44〜45に示すが本発明のペプチドを無添加の場合(点線)では、活性化プロテインCの生成は認められなかったが、本発明のペプチドE456A spまたはE456G luを添加した場合には、反応時間と共に生成した活性化プロテインCの量が増加した。

【0132】(6) 抗血液凝固作用の測定

本発明のペプチドがトロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの転換を阻害し、血液凝固を実質的に阻害することは、実施例4-(7)の方法に従い測定した。結果を図46〜47に示す。トロンビンに比べ、添加した精製ペプチドの量が多くなるにしたがって血液凝固時間の延長が確認された。

(7) 血小板凝集抑制作用の確認

本発明のペプチドがトロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害することは、実施例4-(8)の方法に従い測定した。結果を図48〜49に示す。本発明のペプチドを添加した場合、血小板凝集が抑制された。

【表1】

表 1

プラスミド	試 料	活 性 u/ml	ペプチド量 mg/ml	比 活 性 u/mg
pSVZTMD7	培養液	1210	2.803	5809
pSVZTMD8	培養液	7	0.510	14
コントロール	COS-1細胞培養液	検出されず	検出されず	-

【表2】

表 2

ペプチド	阻害定数 (KI) (μ M)
ペプチド A	阻害活性なし
ペプチド B	阻害活性なし
ペプチド C	95

[表 3]

表 3

菌 株	プラスミド	活 性 (u/ml)
D71	pMTMD7	910
D72	pMTMD7	745
D73	pMTMD7	370
M31	pMTMM3	926
M32	pMTMM3	800
M33	pMTMM3	482
アクレモニウム・クリンゲナム (ATCC11550)	-	0

[0133]

【実施例7】 D71株の培養

前述の実施例6で得られたD71株をMM培地、CM培地30mlにそれぞれ接種した。さらに、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のAntipain (シグマ社、A6271) を添加した上記2種の培地にも接種し、 30°C で2日間振とう培養した。(220 r. p. m) 該培養液1mlを遠心分離にかけ(15000 r. p. m、5分) 上清を回収し、上記実施例1-(3)の方法に従いトロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性の測定を行った。結果を表4に示すが、Antipainを添加した培養のほうが、3~4倍高い活性を示した。

[0134]

【実施例8】 D71株の産生するペプチドの精製

(1) D71株の培養

前述の実施例6で得られた株D71についてCM培地100mlに接種し、 30°C で5日間振とう培養(220 r. p. m)した。その後、遠心(5000 r. p.

m、20min)により菌体を回収後培養液を遠心して上清を回収し、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のAntipain (シグマ社、A6271) 含有のMM培地1Lに植菌し 28°C で4日間培養した。得られた培養上清1Lを0.22 μm のフィルターで濾過した。

【0135】 (2) DIP-トロンビンカラムによる精製

40 上記行程で得られた培養液を20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQセファロースカラムに吸着させ、0.15M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄後、0.3M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出させた。次いでこの画分を透析により脱塩を行った。次いで、N. L. Esm onら[J. Biol. Chem. 257, 859 (1982)]の方法に従って作製したジイソプロピルフォスフォロートロンビンを、P. Cuatrecasas [J. Biol. Chem. 245, 3059 (197500)]の方法に従ってブロムシアン化したアガロースに

結合させて作製したジイソプロピルフォスフォートロ
ンビンアガロースカラム（以下DIP-トロンビンカ
ラムと略す。）を0.2M NaCl含有20mMリン酸
緩衝液（pH7.4）で平衡化し、この画分を通し、活
性画分を吸着させ平衡化するのに用いた緩衝液で洗浄
後、1.0M NaCl含有20mMリン酸緩衝液（pH7.4）
で溶出することによりこの活性画分を得た。次いで、
0.2M NaCl含有20mMリン酸緩衝液（pH7.4）で平衡化
したDIP-トロンビンカラムに再度この画分を通し、活
性画分を吸着させ平衡化するのに用いた緩衝液で洗浄
後、1.0M NaCl含有20mMリン酸緩衝液（pH7.4）で
溶出することによりこの活性画分を得た。この精製品
の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数に
ならい10.0 ($E^{1\%}_{1cm \cdot 280nm} = 10.0$)と規定して、それ
に基づき精製品の量を計算したところ約1mgであつた。
上記行程において精製したE456A spのペプチドにつ
いて、前述の実施例1-(3)の方法に従い、トロンビ
ンによるプロテインC活性化を促進する活性を測定し
たところ図50に示すとおり本発明のペプチドを加えた
場合（点線）には、活性化プロテインCの生成は認め
られなかったが、本発明のペプチドE456A spを添加
した場合には、反応時間と共に生成したプロテインC
の量が増加した。また、精製品をポリアクリルアミ
ドゲル（第一化学薬品製、SDS-PAGプレート15/25,
1010）を用い電気泳動を行い、CB B（クマシー
ブリリアントブルー）染色を行いバンドを観察した
ところ図53（レーン1）に示すとおり分子量24Kと
22Kの2本のバンドが観察された。

【0136】（3）抗TMモノクローナル抗体カラムの
作製

（a）抗TMモノクローナル抗体の取得

抗TMモノクローナル抗体の作製は、Maruyama
らの方法[J. Biol. Chem. 260, 15432 (1985)]
に従った。即ち、胎盤より精製したTMを抗原とし、
Balb/Cマウスに数回免疫後、マウスの脾臓細胞液
を調製し、適当なラインからのマウス骨髓腫細胞
とポリエチレングリコール等の融合促進剤の使用に
より、細胞融合させる。細胞融合に用いるマウス骨
髄腫細胞は、例えば、P3-X63-Ag8-U1細胞（P3-U1）
[Yeltonら, Current Topics in Microbiology and
Immunology, 81, 1 (1978)]等が用いられる。融合
した細胞を適当な選択培地、例えば、HAT（ヒポキ
サンチン・アミノプテリン・チミジン）培地を用い
て選択する。このようにしてハイブリドーマ細胞が
検出された後、その培養上清を採取し、TMに対する
抗体についてTMを固相抗原としたELISA（酵素

免疫定量法）によりスクリーニングする。TMに対す
る抗体を産生するハイブリドーマ細胞を適当な方法、
例えば限外希釈法によりクローン化する。その結果、
2種の抗TMモノクローナル抗体が得られ、それぞれ
抗TMモノクローナル抗体1、2と命名した。

【0137】（b）モノクローナル抗体のエピトープの
決定

抗TMモノクローナル抗体1、2のトロンビンへの結
合は、次のような方法で調べた。前述の実施例1-
（4）-（b）で精製したTMを0.1M 重炭酸ナトリ
ウム緩衝液（pH9.2）で2.5μg/mlとなるよう
に希釈し、50μl/穴となるように96穴の平底ELI
SA用マイクロタイタープレートに分注する。3時間
後、プレートの穴を0.1M 重炭酸ナトリウム緩衝
液（pH9.2）で洗浄し、1%BSA含有PBSを100
μl/穴となるように入れ4℃、一晚ブロッキングを
行う。次いで、抗TMモノクローナル抗体1、2を含
む培養上清を50μl/穴となるように入れ、25℃、
2時間反応させる。次いで、1μg/mlとなるよう
にPBSで希釈したトロンビンを50μl/穴となる
ように入れ、25℃、30分反応させる。PBSで洗浄
後、PBSに0.3mg/mlの濃度で溶解したH-D-Ph
e-Pip-Arg-pNA（カビ社 S2238）を100μl/穴
で加えた。37℃、1時間の反応後、遊離したpNA
（パラニトロアニリン）を410nmの測定波長で測
定した。結果を表5に示すが、モノクローナル抗体
を含まない培地を加えた場合は、トロンビンは、
固相のE456A spに結合し、その状態でS2238を
分解し、pNAを生成する。抗TMモノクローナル抗
体1は、トロンビンのTMへの結合を阻害し、その結
果pNAの生成が減少した。一方、抗TMモノクロー
ナル抗体2は、トロンビンのTMへの結合を阻害せ
ずpNAの生成は、抗体無しの場合と変わらなかつ
た。よってモノクローナル抗体1は、TMのトロン
ビン結合部位を認識し、モノクローナル抗体2は、
TMのトロンビン結合部位以外を認識することが明
らになった。更に、抗TMモノクローナル抗体1、
2の、TMによるトロンビンのプロテインC活性化
の促進作用に対する影響を調べた。即ち、モノク
ローナル抗体を含む培養上清100μlと前述の実
施例1-（4）-（b）で精製したTM（30u/ml）
100μlを混合し、4℃、14時間反応させる。次
いで、前述の実施例1-（3）の方法に従い、トロ
ンビンのプロテインCの活性化を促進する活性の
測定を行った。結果を表6に示す。抗TMモノク
ローナル抗体1、2は、両方ともTMによるトロ
ンビンのプロテインC活性化の促進を阻害した。
以上の結果よりモノクローナル抗体1、2は、両
者ともTM上のトロンビンのプロテインC活性化の
促進に関わる活性部位を認識する。TMのトロ
ンビンのプロテインC活性化の促進に関わる活性
部位は、2つの必須部位即ち、プロテ

ンC結合部位、トロンビン結合部位が必要である。その中で、モノクローナル抗体1は、トロンビン結合部位を認識し、モノクローナル抗体2は、それ以外の活性に関与する部位おそらくプロテインC結合部位を認識するということが明らかになった。

【0138】(c)モノクローナル抗体カラムの作製
2種のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを組織適合性動物、ヌードマウス等の腹腔内に増殖させて得た腹水より、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA-カラム等の分離精製操作により精製した。このようにして精製した抗TMモノクローナル抗体を、それぞれCNBr-activated Sepharose 4B (ファルマシア社、52-1153-00-A1) にファルマシア社のマニュアル (Affinity Chromatography principles & methods) に従いカップリングし、モノクローナル抗体カラムを作製した。このようにして作製したカラムをそれぞれ抗TMモノクローナル抗体カラム1、2と称した。

【0139】(4)抗TMモノクローナル抗体カラム1による精製

上記行程8-(1)で得られた培養液を20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQセファロースカラムに吸着させ、0.15M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄後、0.3M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出させた。この画分にNaClを終濃度0.5Mとなるように添加し、次いで、上記行程8-(3)で作製した抗TMモノクローナル抗体カラム1を0.5M NaCl含有20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化した後に、この画分を通し活性画分を吸着させ、平衡化するのに用いた緩衝液で洗浄後、0.5M NaCl含有0.2Mグリシン・塩酸緩衝液(pH2.5)で溶出することによりこの活性画分を得た。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならい10.0 ($E^{1\%}_{1cm} \cdot 280nm = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約1mgであった。上記行程において精製したE456Aspのペプチドについて、前述の実施例1-(3)の方法に従い、トロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性を測定したところ図51に示すとおり本発明のペプチドを加えない場合(点線)には、活性化プロテインCの生成は認められなかったが、本発明のペプチドE456Aspを添加した場合には、反応時間とともに生成したプロテインCの量が増加した。また、精製品をポリアクリルアミドゲル濃度15-25%のグラジエントのSDS-ポリアクリルアミドゲル(第一化学薬品製、SDS-PAGプレート15/25, 1010)を用い電気泳動を行い、CBB(クマシーブリリアントブルー)染色を行いバンドを観察したところ図53(レーン2)に示すとおり分子量

24Kと22Kの2本のバンドが観察された。

【0140】(5)抗TMモノクローナル抗体カラム2による精製

上記行程8-(1)で得られた培養液を、20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したQセファロースカラムに吸着させ、0.15M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で洗浄後、0.3M NaCl含有5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で溶出させた。この画分にNaClを終濃度0.5Mとなるように添加し、次いで、上記行程8-(3)で作製した抗TMモノクローナル抗体カラム2を0.5M NaCl含有20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化した後に、この画分を通し活性画分を吸着させ、平衡化するのに用いた緩衝液で洗浄後、0.5M NaCl含有0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)で溶出することによりこの活性画分を得た。次いでこの画分を透析により脱塩を行った。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならい10.0 ($E^{1\%}_{1cm} \cdot 280nm = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約1mgであった。上記行程において精製したE456Aspのペプチドについて、前述の実施例1-(3)の方法に従い、トロンビンによるプロテインC活性化を促進する活性を測定したところ図52に示すとおり本発明のペプチドを加えない場合(点線)には、活性化プロテインCの生成は認められなかったが、本発明のペプチドE456Aspを添加した場合には、反応時間とともに生成したプロテインCの量が増加した。また、精製品をポリアクリルアミドゲル濃度15-25%のグラジエントのSDS-ポリアクリルアミドゲル(第一化学薬品製、SDS-PAGプレート15/25, 1010)を用い電気泳動を行い、CBB(クマシーブリリアントブルー)染色を行いバンドを観察したところ図53(レーン3)に示すとおり分子量24Kと22Kの2本のバンドが観察された。

【0141】(6)N末端アミノ酸配列の確認

上記行程8-(2)、(4)、(5)で精製したE456Aspについて、それぞれ2μgを水で透析し、アミノ酸配列分析用試料とした。次いでアミノ酸シーケンサー(アプライドバイオシステム モデル 470A)を用い、R. M. Hewickらの方法[J. Biol. Chem, 256, 7990 (1981)]に従いN末端側より順次エドマン分解を行った。遊離してくるフェニルチオヒダントイン・アミノ酸をHPLC(スペクトロフィジックス社、SP8100)及び、ゾルバックODSカラム(デュボン社)を用い分析を行い、N末端アミノ酸配列を決定した。その結果、それぞれのペプチドは全て下記に示すアミノ酸配列を持つことが明らかになった。

Asp-Pro-X-Phe-Arg-Ala-Asn
-X-Glu-

Tyr-Gln-X-Gln-Pro-Leu-X-G
ln-Thr-
Ser-Tyr (Xは不明のアミノ酸)

[0142]

【実施例9】

(1) プラスミドpSV2TMD9の構築

部位特異的変異の手法を用いてディレーターTMd3の代わりに、下記の塩基配列：5'-CGGAGGCCGCTCAGATGTCCGTGCA-3' (25mer) を有するディレーターTMd9を用いる以外は上記実施例1-(1)-(a)と実質的に同様の方法で、実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7の一部を削除して、114塩基の削除を行い、TMD9と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13TMD9を得た。このTMD9は、開始コドン(ATG)から18番目のアミノ酸、及び、367番目から442番目のアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。図54に組換え体プラスミドM13TMD7とディレーターTMd9がハイブリダイズしてDNA断片TMD7に対応するDNA領域の一部が削除されることを示す。更に、この組換え体プラスミドM13TMD9のDNAをHindIII及びBamHIで完全消化して、TMD9の約580bp DNA断片を単離した。一方プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得、このベクターと上記580bp DNA断片とをT4 DNAリガーゼを用いてつなぎあわせ、プラスミドpSV2TMD9を得た。

[0143] (2) pSV2TMD1、pSV2TMD7及びpSV2TMD9のCOS-1細胞へのトランスフェクション

実施例1-(4)-(a)で構築したpSV2TMD1、実施例1-(1)-(b)で構築したpSV2TMD7、上記実施例で構築したpSV2TMD9のCOS-1細胞へのトランスフェクションは、前述の実施例1

-(2)の方法に従った。それぞれのプラスミドについて、30回のエレクトロポレーションを行い、培養液をそれぞれ約300ml得た。

[0144] (3) ペプチドの精製、定量

前述の実施例で得られた培養液300mlについて実施例3-(3)の方法に従い、精製を行った。この精製品について実施例1-4-(c)で作製したウサギ抗ヒトロンボモジュリン抗体及び、実施例8-(3)で作製した抗ヒトモノクローナル抗体1を用いたサンドイッチELISAで定量したところそれぞれ約30μgのペプチドが得られた。pSV2TMD1をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをD123Asp、pSV2TMD7をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE456Asp、pSV2TMD9をトランスフェクトしたCOS-1細胞の培養液から精製したペプチドをE45と称した。

[0145] (4) プロテインCの活性化を促進する活性の測定

20 上述の実施例で精製したペプチドについて以下の方法に従いプロテインCの活性化を促進する活性の測定を行った。即ち、10μlのペプチド水溶液(10nM)、10μlのトロンビン(15nM)、10μlのプロテインC(3.2μM)、10μlの10×アッセイ緩衝液(1M NaCl、20mM CaCl₂ 1%BSA含有0.5M Tris·HCl, pH7.5)及び、蒸留水60μlを混合した。37℃で1時間反応後、アンチトロンビンIIIを終濃度100nM、ヘパリンを終濃度1u/mlで添加することにより反応を止めた。活性化プロテインCの濃度は、0.05M Tris·HCl pH8.0 1M CaCl₂を含む緩衝液中で200μMの濃度のBoc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCAを基質として遊離するAMC(7-アミノ-7-メチルクマリン)濃度を励起波長380nm、測定波長440nmで測定した。結果を表7に示す。

【表4】

表 4

菌株	培地	Antipain	活性 (u/ml)
D71	MM	なし	1000
D71	CM	なし	900
D71	MM	あり	4000
D71	CM	あり	3500

【表5】

表 5

モノクローナル抗体	A410 吸光度
1	0.158
2	0.742
なし (培地のみ)	0.757

【表6】

表 6

モノクローナル抗体	活性 (u/ml)
1	0
2	0
なし (培地のみ)	15.5

【表7】

表 7

ペプチド	生成した活性化プロテインC (pmol)
D123Asp	18.6
E456Asp	18.3
E45	1.7

【0146】

【参考例】 参考例に記載の略称ないし略号は、以下の通りのものである。

マニアティスの実験書：T. Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory 1982
N-3シード培地：コーンステーパーリカー40g/ビート20g/酢酸アンモニウム2g/スイトース40gを水1Lに溶解したもの。

メイン培地：ビート30g/脱脂大豆40g/コーンステーパーリカー10g/酢酸アンモニウム5g/硫酸アンモニウム7g/硫酸カルシウム8g/炭酸カルシウム15g/スイトース60g/メチルオレイト41.5を水1Lに含むもの。

CMG培地：グルコース20g/リン酸二水素カリウム

0.5g/リン酸水素二カリウム0.5g/塩化カリウム0.5g/硫酸マグネシウム(7水塩)0.5g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.01g/硝酸ナトリウム3g/イーストエキストラクト4g/ペプトン10gを水1Lに溶解したもの。

40 CM培地：ショ糖20g/リン酸二水素カリウム0.5g/リン酸水素二カリウム0.5g/塩化カリウム0.5g/硫酸マグネシウム(7水塩)0.5g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.01g/硝酸ナトリウム3g/イーストエキストラクト4g/ペプトン10gを水1Lに溶解したもの。

CM固形培地：1.5%の寒天を含有するCM培地。

GAG培地：グリセロール40g/アスパラギン4g/塩化カルシウム0.1g/塩化ナトリウム0.1g/微量金属溶液(硫酸マグネシウム(7水塩)4g/硫酸鉄(II)(7水塩)0.4g/硫酸マンガン(4水塩)

50

0.16 g/硫酸亜鉛(7水塩) 0.4 g/無水硫酸銅
0.04 gを水1 Lに溶解したもの) 25 ml/0.1
Mリン酸バッファー(pH7.0) 30 mlを水1 Lに
含有する培地。

P-バッファー: 0.6 M塩化カリウム/0.01 M塩
化マグネシウム/0.025 M塩化カルシウム。

PEG溶液: 25%ポリエチレングリコール(約400
0)/0.01 Mトリス(pH8.0)/0.05 M塩
化カルシウム/0.6 M塩化カリウム。

[0147]

【参考例1】

参考例1-(1) pPGACY2の構築

図56に示される工程に従って、SE-83株(微工研
菌寄第7649号)由来のセファロsporin C・アシラ
ーゼ遺伝子をアクレモニウム・クリソゲナム由来のPG
Kプロモーター支配下に発現させるためのプラスミドp
PGACY2を構築した。以下に各工程を説明する。

[0148] (i) ACYリンカーの作製

セファロsporin C・アシラーゼ遺伝子の開始コドン
をアクレモニウム・クリソゲナムPGK遺伝子の開始コ
ドンの位置に正確に一致させるため、図56中に示す配
列を有するACYリンカーを作製した。作製の詳細は以下
のとおりである。まず次の配列を有する4種類のオリ
ゴヌクレオチド:

① CGCGTCGATTCACAGTCAAATG
ACGAT

② GGCGGCCAAGACCGATCGCGAGG
CCCTGCA

③ GCCGCCATCGTCATTTTGACTGT
GAATCGA

④ GGGCCTCGCGATCGGTCTTG

を自動DNA合成機(アプライド・バイオシステム社の
DNAシンセサイザー・モデル380-A)を用いて常
法どおり合成した。次いで、上記オリゴヌクレオチド②
及び③の5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによ
りリン酸化した後、オリゴヌクレオチド①及び④と混合
しアニリングせしめ、T4リガーゼで連結すること
によりACYリンカーを得た。

[0149] (ii) pPGACY2の作製

まず、pAMK3をSma Iで消化し、線状化した。そ
してこれにBamHIリンカーをT4リガーゼにより連
結した後、Pst IとBamHIで同時に切断し、N末
端コード域の一部を欠いたSE-83株由来のセファロ
sporin C・アシラーゼ遺伝子を含有するPst I-B
amHI断片(2.3 Kb)を分解、精製した。一方、
pGKCS'をMlu I, Bgl IIで切断し、約4.
8 KbのDNA断片を分離、精製した。ついでこれら2
種の断片と上記(1)により得たACYリンカーとをT
4リガーゼを用いて連結することによりpPGACY2
を得た。尚、本参考例1でSE-83由来のセファロ

sporin C・アシラーゼ遺伝子の供給源として使用したプ
ラスミドpAMK3の造成方法は、特開昭61-152
286及び松田らの文献(Journal of Ba
acteriology (1987), 169, 5815
-5820)に記載されている。また、アクレモニウム
・クリソゲナム由来のPGKプロモーター並びにターミ
ネーターの供給源として用いたプラスミドpGKCS'
はアクレモニウム・クリソゲナム由来のPGKプロモ
ーター、PGKターミネーターを含む断片がユニーク制限
10 酵素部位を介して発現に好適な配置でつながった構造を
有するプラスミドであり、その造成方法は、参考例2-
(2)に記載した。

[0150] 上記参考例1-(1)において制限酵素消
化により生ずるDNA断片の分離は、すべて1%アガロ
ースゲル電気泳動により行い、アガロースゲルからのD
NA断片の単離精製は、ジーンクリーン(GENE・C
LEAN™, フナコシ社販)を用いて、その添付プロ
トコールに従って行った。また、DNA断片の結合反
応、該反応により生ずるプラスミドを用いた大腸菌の形
質転換、得られた形質転換体からのプラスミドの調製及
20 びその解析等の基本操作は、すべてマニアティスの実験
書に記載された方法に準じて行った。

[0151] 参考例1-(2) pPGACY2による
アクレモニウム・クリソゲナムの形質転換
pACTHY83との同時形質転換により、pPGAC
Y2によるアクレモニウム・クリソゲナムの形質転換体
(セファロsporin C・アシラーゼ産生能を獲得した新
規アクレモニウム・クリソゲナム)を取得した。以下に
その詳細を説明する。尚、本参考例1-(2)で使用し
30 たpACTHY83は、アクレモニウム・クリソゲナム
内で機能しうるハイグロマイシンBホスホトランスフェ
ラーゼ発現単位(アクレモニウム・クリソゲナム由来ア
クチン遺伝子のプロモーター及びターミネーター、細菌
由来のハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺
伝子が発現に好適な配置で結合した発現単位)を有する
アクレモニウム・クリソゲナム形質転換用ベクターであ
り、その造成法は、参考例2に記載した。

[0152] (i) プロトプラストの調製

CM固形培地上で30℃で5日間生育させたアクレモニ
ウム・クリソゲナムIS-5の菌糸体をCM培地50 ml
40 に接種し、回転式振とう機(250 r. p. m)上、
30℃で3日間培養した。更に該菌液1 mlを50 ml
のGAG培地に接種して、30℃で20時間培養した。
得られた培養液50 mlを3500 r. p. mで10分
間遠心し、菌糸体を沈澱させた後、0.9%のNaCl
溶液で洗浄し、0.01 Mジチオスレイトールを含んだ
マクイルベイン緩衝液(0.1 Mクエン酸、0.2 Mリ
ン酸ナトリウム、pH7.3) 20 mlに懸濁し、30
℃で1時間、おだやかに振とうした。次いで菌糸体を3
50 200 r. p. m 10分間の遠心で沈澱させ、P-バッ

ファーで洗浄した後、ノボザイム (Novo社) を10 mg/mlの濃度で含有するP-バッファー10mlに懸濁し、30℃で1時間おだやかに振とうした。該反応液を800 r. p. mで30秒間遠心して得た上清を、濾紙 (TOYO FILTER PAPER 5A) を用いて濾過することにより、菌糸体とプロトプラストを分離した。次いで、該濾液を3000 r. p. mで5分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた後、P-バッファーで一回洗浄し、プロトプラストが 3×10^8 個/mlの濃度となるようにP-バッファーに懸濁した。

(ii) pPGACY2, PACTHY83によるプロトプラスト形質転換

上記(1)で得たプロトプラスト懸濁液0.1mlにpPGACY2とpACTHY83を5 μ gずつ含む溶液10 μ lを加えた後、0.05mlのPEG溶液を加え、かるく混合した。該混合液を氷上に25分間静置した後、同様のPEG溶液を1ml加えて、室温で更に30分間静置した。かくして得られた形質転換プロトプラスト懸濁液を0.2mlずつプロトプラスト再生培地

〔文献 (イソガイら, Agric. Biol. Che

5' TGGCCGAGGCGGCCAGATCTCCATGG 3'
3' ACCGGCTCCGCCGGTCTAGAGGTACC 5'

尚、pSFI-1のマルチクローニング部位の塩基配列を常法に従って決定し、上記SFリンカーの配列及びpSFI-1における該リンカーの挿入方向が図57に示すとおりであることを確認した。かくして得たpSFI-1のHincII部位に同様のSFリンカーを図57に示す方向で挿入することにより、pSFI-2を得た。挿入方向の確認はpSFI-1の場合と同様に行った。pSFI-2は図57に示すとおり同一のSfiI部位の間に多数のクローニング部位を有する構造をしており、同一方向にのみ連結可能な断片を調製するのに有用なベクターである。

【0155】 (ii) pBSFAHY83の構築 (図58)

グラム陰性細菌の広域宿主用コスミドベクターであるpLAFR1 (ATCC37167) をBglIIで切断し、COS部位を有する1.6Kbの断片を分離精製した。該断片とBglIIで切断し、アルカリフォスファターゼ処理を施したpSFI-1 (上記(i)参照) とをT4リガーゼで連結することによりpBSF1を得た。次いで、pACTHY83をHindIII、SacIで切断し、3.5KbのHYB発現単位断片 (参考例1-(2)参照) を分離精製し、該断片を上記pBSF1のHindIII-SacI間に挿入することによりpBSFAHY83を得た。pBSFAHY83は、上記pSFI-2を利用して調製されるSfiI断片を同一方向に多数連結した状態でクローン化し、アクレモニウム・クリソゲナム内に導入するのに適したコスミドベクターである。尚、本工程で使用したpPGKM5の

m. 1987, 51, 2321-2329) に記載されているBRM培地) を25ml含有するプレート上に広げ15℃で20時間培養した。次いで、該プレートに4.5mgのハイグロマイシンBを含み、50℃に保温した同様のBRM培地5mlを重ねた後、28℃で14日間培養した。その結果、ハイグロマイシンBに耐性となった形質転換体 (以下、HYB形質転換体と略す。) が70株出現した。

【0153】 参考例1-(3)

10 図57, 58に示される工程に従って、pBSFAHY83を構築した。以下に、各工程を説明する。

【0154】 (i) pSFI-2の構築 (図57)

まず、pUC18 (宝酒造社) をEcoRIで切断し、生じた粘着末端をDNAポリメラーゼクレノウ断片と4種のデオキシヌクレオチド3リン酸を用いて平滑末端に交換した。ついで、該断片と下記の配列からなるSFリンカー (DNA合成機を用いて、常法どおり2本の一本鎖DNAとして合成した。) とをT4リガーゼにより連結しpSFI-1を得た。

造成法は、参考例2に例示されている。上記工程において、制限酵素消化により生ずるDNA断片の分離精製、DNA断片間の結合反応、該反応により生ずるプラスミドによる大腸菌の形質転換、得られた形質転換体からのプラスミドの調製及びその解析等の基本操作は、参考例1-(1)並びにマニアティスの実験書に記載された方法に準じて行った。

30 【0156】

【参考例2】

参考例2-(1) (アクレモニウム・クリソゲナムホスホグリセレートキナーゼ (PGK) 遺伝子の単離)

(i) アクレモニウム・クリソゲナムの遺伝子ライブラリー作製

アクレモニウム・クリソゲナムIS-5株 (微工研菌寄第11232号) の全DNAをジョンストン (I. L. Johnstone) らがアスペルギラス・ニデウランズについて用いた方法 [文献: エンボジャーナル (EMBOJ.) 4, 1307-1311, (1985)] に従って抽出した。そしてこの全DNA約60 μ gを制限酵素MboIで部分消化し、次いでアルカリフォスファターゼで処理した。一方ラムダベクターEMBL3 (プロメガバイオテックス社) 10 μ gをBamHIとEcoRIで完全に消化し、イソプロパノール沈澱により、短いEcoRI-BamHIリンカー部分を除去した。

【0157】 次いで、上記部分消化DNA断片約1 μ gとBamHI末端を有するベクター約2 μ gとをT4リガーゼを用いて連結せしめ、ラムダファージ粒子内へ封入した。こうして得た組換えファージ懸濁液を適当に希

釈し、エシェリシア・コリ (*E. coli*) NM539 (プロメガバイオテックス社) に感染させ、出現するプラーク数を計測した。その結果この懸濁液は、 3×10^5 個の組換えファージを含有することが判明した。このファージ液をアクレモニウム・クリソゲナムの遺伝子ライブラリーとし、4℃に保存した。尚、上述の供与体DNA及びベクターの調製、そして両者の結合等に関する詳細な方法、条件はフリッシャーフ (Frischauer) が記載したものを採用した。[ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.), 170, 827-842, (1983)] またDNAのラムダ粒子内への封入は、プロメガバイオテックス社のパッケージングエクストラクトを用い、それに添付されたプロトコールに従って行った。

[0158] (ii) プローブの調製
pYPGKI (サッカロミセス・セレビスエ由来PGK遺伝子全体を含む2.9KbのHindIII断片を有するこのプラスミドは、サッカロミセス総DNAのHindIII消化物をPBR327 (ATCC37516) のHindIII部位に挿入して作製された遺伝子ライブラリーを、既にヒツツマン等により報告されている、サッカロミセスPGK遺伝子の塩基配列 [文献;ヌクレックアシッドリサーチ (Nucleic Acids Res.), 10, 7791-7808, (1982)] をもとに設計された合成オリゴヌクレチド:
5'-CAGATCATCAAGAAGTAATTATCT-3' を用いてスクリーニングすることにより得られた。) 20μgをHindIIIとEcoRIで消化後、1%アガロースゲル電気泳動を行った。そして、マニアティス (T. Maniatis) ら著モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリー・マニュアル、ワールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー出版、1982年 (T. Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, 以下この成書をマニアティスの実験書と略す。) p164-165に記載されている方法に従って、2.9Kbの断片をゲルから回収、精製した。そして、この断片約200ngを宝酒造株式会社製ニックトランスレーションキットを用い、それに付属するプロトコールに従って、($\alpha^{32}P$) デオキシシチジン3リン酸 (dCTP) 50μCiで標識した。次いで反応液を70℃で10分間加温した後、ファルマシア社製ニックカラム (Pharmacia社, Nick-columnTM) を用いて、精製し、約 10^7 cpmの放射能を持つプローブを得た (以後このプローブをYPプローブと称する。)

[0159] (iii) ハイブリダイゼーションによるスクリーニング

(i) で得られたファージ液 (遺伝子ライブラリー) の

一部をNM539に感染させ、4枚のプレートに計 2×10^4 個のプラークを形成させた。これらプラークをベントン (Benton W. D.) らの方法 [文献:サイエンス (Science), 196, 180-182, 1977.] に従って、ニトロセルロースフィルターに転写し、アルカリ変性、中和処理を行い、DNAを固定した後、上記 (ii) で得たYPプローブとハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーションは、30%ホルムアミド、5×デンハルツ、5×SSPE、0.1% SDS、及び終濃度 5×10^5 cpm/mlでYPプローブを含有する溶液を用いて、42℃で16時間行った。続いて、フィルターを0.1%のSDSを含む6×SSC溶液中、室温で10分間づつ2回洗浄し、さらに0.1%のSDSを含む1×SSC溶液中42℃で30分間洗浄した。次いでインテンシファイヤー・スクリーンを用いて、-80℃で16時間オートラジオグラフィを行った。この結果7個の陽性スポットが見出された。そのうち、4個の陽性スポットに相応する寒天領域よりファージを抽出し、再度上記の工程に従ってプラークハイブリダイゼーションを行い、4個の純化ポジティブファージクローンを得た。これらのクローンをそれぞれλ-PGK1, 2, 3, 4と命名した。

[0160] (iv) PGK遺伝子のサブクローニング及びその位置の限定

(iii) で得たファージクローン4種より、グロスバーガー (Grossberger) 記載の方法 [文献:ヌクレックアシッドリサーチ (Nucleic Acids Research), 15, 6737] に従ってDNAを抽出した。次いでこのラムダDNAをBamHIで切断して、アガロースゲル電気泳動を行った後、YPプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション [方法については文献:サザン (Southern), ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.), 98, 503-517, (1975)] を行った。尚、ハイブリダイゼーション及びフィルター洗浄等は、(iii) に記載したものと同様に行った。その結果、すべてのクローンに存在する、約5.5KbのBamHI断片のみが該プローブとハイブリダイズすることが判明した。この断片をジーンクリーン (GENE-CLEANTM, フナコシ社) を用いて、添付プロトコールに従って、アガロースゲルから回収、精製した。一方ベクターとして用いるpUC18 (宝酒造株式会社) はBamHIで切断し、アルカリホスファターゼ処理を行った。次いで両者をT4リガーゼにより連結し、マニアティスの実験書p252~p253に記載の方法に準じて、*E. coli* JM105に導入した。アンピシリン (Amp), 100μg/ml、5-ブロム-4-クロル-3-インドリル-β-ガラクトシド (X-Gal), 0.004%を含有するL-ブロス寒天培地上に生育して来た白色コロニーを6個選び、簡

便法（マニアティスの実験書p368～p369に記載の方法）でプラスミドDNAを抽出し、BamHI消化による解析を行ったところ6クローン中のプラスミドに、目的の断片が挿入されていることが判明した。さらに上記と同様、サザンハイブリダイゼーションによる解析を行い、このインサートが目的の断片であることを確認した。これらのうちプラスミドの1つをpGK5と命名した。

【0161】該プラスミドpGK5を種々の制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動により解析した結果、図59に示される5.5Kbインサートの制限酵素切断地図が得られた。次いでこの断片中に存在するPGKコード領域を限定するために、YPプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、約0.7KbのPstI-StuI断片内に、PGKコード領域の少なくとも一部が存在することが推定された。

【0162】(v) アクレモニウム・クリソゲナムPGK遺伝子の塩基配列

まず、PGK遺伝子のコード領域の一部を含むと推定された0.7KbのPstI-StuI断片をM13mp18及びM13mp19のSmaI-PstI間にそれぞれサブクローニングして、各々の配列の一部をサンガーの方法（Sanger, F, サイエンス Science 214, (1981) 等）に基づき決定した。そして既知のPGK遺伝子と比較することにより、遺伝子の方向、及び、この領域がPGKタンパクのどの部分をコードしているかを推定した。該領域から上流及び下流に向かって配列決定を行い、最終的に図59にアンダーラインで示した全領域をカバーする、3306bpの塩基配列を決定した。

【0163】塩基配列決定の具体的実験手技は、タカラのシーケンシングキットを用いて、その添付プロトコールに従って行った。尚、決定した全塩基配列及び予想される翻訳産物を図61に示した。遺伝情報処理ソフトウェア（SDCソフトウェア開発株式会社）を用いて、この配列をコンピューター解析した結果以下のことが判明し、前述の工程を経て、単離してきた遺伝子が真のP

5' CGCGTCGATTACAGTCAAAAGATC-3'
3' AGCTAAGTGTCAGTTTTCTAGAGCT-5'

又pGKBLの代わりにpGKBL'を用いて同上の操作を行いpGKCS'も構築した。pGKCS及びpGKCS'はアクレモニウム・クリソゲナム由来のPGK・プロモーター、ターミネーターを含む断片がユニーク制限酵素部位（BglII, XhoI）を介して発現に好適な配置でつながった構造を有するプラスミドであり、種々の外来遺伝子をアクレモニウム・クリソゲナム内で発現させるためのベクターを構築する際有用な出発材料となる。尚、上記リンカーは、アプライド・バイオシステム社のDNAシンセサイザー・モデル380-Aを用い、常法どおり、2本の1本鎖として合成された。

GK遺伝子であるという確証を得た。

【0164】1) アクレモニウム・クリソゲナムのPGK遺伝子は、418個のアミノ酸からなる、分子量44,300ダルトンのタンパクをコードする。2) コード領域は145,64bpからなる2つのイントロンにより分断されている。そのイントロンの大きさは異なるが存在位置は、同じ糸状菌である、アスペルギラス・ニデウランスのPGK遺伝子と同一であった。3) 塩基配列から予想されるアミノ酸の一次構造は、ヒト、サッカロミセス・セレビシエ、アスペルギラス・ニデウランス由来のPGKのものと非常に類似しており、それぞれ68,70,75%の相同性を示した。尚、上記のごとく構造を決定したBglII-KpnI断片（図59

(A) 領域）はPGK遺伝子の開始コドン（ATG）から5'上流1251bpに及び領域をカバーしており、目的とするPGKプロモーターは、該断片上に存在すると考えられる。以下に示す参考例2-(2), (3)はこの推定が正しいことを強く支持した。

【0165】参考例2-(2) (pPGKM5の構築)

20 図63に示される工程に従って、細菌由来のネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（以後Km^r遺伝子と略記する。）をアクレモニウム・クリソゲナム由来のPGKプロモーター支配下に発現されるためのプラスミドpPGKM5を構築した。以下に各工程を説明する。

【0166】(i) pGKBLの作製

参考例2-(1)-(iv)で得たプラスミドpPGK-5をBglIIで消化し、PGK遺伝子を含む3.6Kbの断片を分離精製した。該断片を参考例2-(1)-(iv)で調製した、pUC18のBamHI部位に30 挿入することによりpGKBLを得た。また同上の断片が、pGKBLとは逆方向に挿入されたプラスミドも同時に取得し、これをpGKBL'と命名した。

【0167】(ii) pGKCSの作製

上記(i)で得たプラスミドpGKBLをMluIとXhoIで切断し、4.8Kbの断片を分離・精製した。該断片と次式で示される合成リンカーを連続することによりpGKCSを得た。式：

40 【0168】(iii) pPGKM5の作製

プラスミドpEX002をBamHIとBglIIで切断し、Km^r遺伝子を含む1.5Kbの断片を分離精製する。該断片をBglIIで切断し、アルカリホスファターゼ処理を施した、pGKCSと図63に示す方向で結合させることにより、pPGKM5を得た。尚、上記で用いたプラスミドpEX002は、lacUV5・プロモーター及び、トランスポゾン5(Tu5)由来のKm^r遺伝子を有する大腸菌用発現ベクターであり、その造成方法は、特開昭63-74488に記載されてい

50 る。

【0169】以上参考例2-(2)において、制限酵素消化断片の分離は、すべて1%アガロースゲル電気泳動により行い、アガロースゲルからのDNA断片の調製は、ジーンクリーン (GENE・CLEAM™、フナシコ社販) を用いて、その添付プロトコールにしたがって行った。また、プラスミドとDNA断片の連結、大腸菌のトランスフォーメーション等、ならびにサブクロニングの結果得られたプラスミドの調製、解析等の基本操作は、すべてマニアティスの実験書に記載された方法に準じて行った。

【0170】参考例2-(3) [pPGKM5を用いたアクレモニウム・クリソゲナムの形質転換]

(i) プロトプラストの調製: CM固形培地上で30℃で5日間生育させたアクレモニウム・クリソゲナムIS-5の菌糸体(約1cm²に相当する菌糸体)を、CM培地50mlに接種し、回転式振盪機(250r.p.m)上、30℃で3日間培養した。さらに該菌液1mlを50mlのGAG培地に接種して、回転式振盪機(250r.p.m)上、30℃で20時間培養した。得られた培養液50mlを3500r.p.mで10分間遠心し、菌糸体を沈澱させた後、0.9%のNaCl溶液で洗浄し、0.01Mジチオスレイトールを含んだマクイルペイン (Mcilvaene) 緩衝液(0.1Mクエン酸、0.2Mリン酸ナトリウム、pH7.3) 20mlに懸濁し、30℃で1時間、穏やかに振盪した。ついで菌糸体を3200r.p.m10分間の遠心で沈澱させ、Pバッファーで洗浄した後、ノボザイム (Novo社製) を10mg/mlの濃度で含有するPバッファー10mlに懸濁し、30℃で1時間穏やかに振盪した。該反応下記を800r.p.mで30秒間遠心して得た上清を、濾紙 (TOYO FILTER PAPER

R 5A) を用いて濾過することにより、菌糸体とプロトプラストを分散した。次いで該濾液を3000r.p.mで5分間遠心し、プロトプラストを沈澱させた後、Pバッファーで1回洗浄し、プロトプラストが 3×10^8 /mlの濃度となるようにPバッファーに懸濁した。

【0171】(ii) pPGKM5によるプロトプラスト形質転換

上記(i)で得たプロトプラスト懸濁液0.1mlに、
10 プラスミドpPGKM5を5μg(10μl)を加えた後、0.05mlのPEG溶液を加え、かるく混合した。氷上に25分間静置した後、同上のPEG溶液を1ml加えて、室温でさらに30分間静置した。かくして得られた形質転換プロトプラスト懸濁液を0.2mlづつプロトプラスト再生培地 [文献 (Isogaiら: Agric. Biol. Chem. 1987, 51, 2321~2329) に記載されているBRM培地] を25ml含有するプレート上に広げ15℃で20時間培養した後、3mgのG418を含み50℃に保温した同上の
20 BRM培地5mlを重ねた。そして28℃で10~20日間培養することにより、G418耐性となった形質転換株を選択した。以上の実験を数回行ったところ、pPGKM5、5μgあたり50~150個のG418耐性株が出現した。これに対してコントロールプラスミドpEX002を用いて同上の実験を行った場合、0~2個のG418耐性株しか出現しなかった。以上の結果は下記式1に示した配列を有する、pPGKM5上のXbaI-BglII断片内に、アクレモニウム・クリソゲナムPGK遺伝子のプロモーターが含まれていることを
30 強く示唆している。

式1:

61

AGATCTTTTCAGGATGGTGCTGATGGGGGCCAGGGGC
AAAACA
CCACCGGGTGATCCTCGACGTGGAGGTTGTGATAGA
AGGAGA
GCAAGGGGACGATGATGATGTGGACCTTGTGATTGA
GGAGGA
TCATGGCGATGAGGATGAGGAAGAGGATTTACCCGA
TCTGAT
CGATCCTCCCCCGAACGACGGGGACCAGGAGCGGGA
GGGAGC
AGCCGGGACAGAGGCGATCAGGCGCGAGGGTCAAGA
ACCAGA
CCGACAAGGCCAGCACCAAGAACAGCAACCGGCAGC
ACCGGA
GGCACCCGCAGCGGACGAGCAGCTCCCGCCACAGAA
CAACCA
CGAAGTACCGCCCGCCCGCCGGCCAACCGCGTCGG
TCTGGG
CACCGTCCTGTCCAATTCTCAAACCAGCTCGTCAG
CGCCCT
CATCCTGCCGGGAATCTCCTTCGCCATGGGGGAAGC
TCTACG
GGTGGCGCTCCCCGCCAGGTGGACACAGTCGTCTCT
GTGCCC

62

CTTTAGGAACGCCCTCCGGGCTACTCCAGCAGCAG
 TGGGGT
 CGCAGCCTCGTGGGTGGGTGCCTGTACGTGTGATCA
 AGGACG
 TGATCCGGGTCTACGCCAAGCACCGCAAGGTGGCCC
 CTATGG
 GCAACCGGCGGGTCAGAAACGTGGACCGGCCAAGGA
 GGAACG
 CGGGCTCGTCGAGATGAAATCCAGTGATACAACGCA
 GCATGG
 GAACGCAGTTTGGGCTGGCCAGGGTAGATGACGGTA
 TCCAAG
 GATTATACTATTAATATAGCGACTACTAGTAATTAC
 TACTGG
 GCAGAGTCTACCGCCCAACGTTGGTATGGGTTATTT
 GTAAAC
 GTTCCACGCCAATCTTTTCCACCGTCAGAATCGGCG
 TATCAT
 TGCAATTGACGGCACCAGAATGATGCGTTGGTACTA
 ATAGTA
 GGTACGAGGTAACAACAGTAAAGATACTGCCATTAT
 AGAAAG
 AGGAAGTCGCTCCCTCGGCAATGCCGCGCCACAAGC
 GCCTTT
 GGCCGAGGACGCCGGAACCCAAACGCAGATCAGATC
 GGGGGC
 AACGGGAAGCTTAGGGACGCAAATGGGGTAATACGA
 GTAATA
 ATCCCCCACCACCACCAAGAAGCTCCCAACCCAAA

AGCTTCC
 TCGGTCCTTTTCACCCCGCCATCTTCTCCCGACAG
 AAAGACA
 AAACAACCCACCATACCACTCCACAGAGCATTGTT
 CTTCTCC
 TTCAGGACTACCACGCGTCGATTACACAGTCAAA

尚、上記耐性株の染色体中に、導入に用いたプラスミド 半を含むpEX002のPst I断片(約900bp)
 が挿入されていることは、Km^R遺伝子コード領域の大 50 をプローブとした、サザンハイブリダイゼーション実験

により確かめられた。

【0172】参考例2-(4)〔アクチン遺伝子のクローニング〕

(i) ハイブリダイゼーションによるアクチン遺伝子含有クローニングのスクリーニング³²Pで標識したヒトβ-アクチン遺伝子の第3エクソンを含む、HinfI 400bp断片(和光純薬販)をプローブ(以下ACTプローブと略す。)として用い、参考例2-(1)-

(i) で作製したアクレニウム・クリソゲナムの遺伝子ライブラリーを参考例2-(3)と同じ条件でスクリーニングし、該プローブとハイブリダイズする4個のファージを取得した。

【0173】(ii) アクチン遺伝子のサブクローニング及びその位置の限定

(i) により得られたファージの1つからDNAを抽出し、これをλACT5と命名した。ついでλACT5をXhoI, SalIで、それぞれ消化し、アガロースゲル電気泳動を行った後、上記ACTプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果5.4KbのXhoI断片、1.3Kb及び1.5Kbのサイズを有する2種のSalI断片が該プローブとハイブリダイズすることが判明した。そこでこれら3種の断片(XhoI-5.4K断片、SalI-1.5K断片、SalI-1.3K断片)を各々pUC18のSalI部位にサブクローニングすることにより、pACT5X, pACT5SS, pACT5SLを得た。ついでこれらのプラスミドの部分制限酵素地図を作製し、それらをオーバーラップさせることにより、アクチン遺伝子を含むと思われる約6KbのDNA断片の部分制限酵素地図を図60に示すとおり作製した。

【0174】尚、上記サザンハイブリダイゼーションはACTプローブを使用したこと以外はすべて参考例2-(1)-(iv)と同様の条件で行った。

【0175】(iii) 塩基配列の決定及び解読

上記(ii)の結果より、0.7KbのSmaI-XhoI断片内に、アクチンコード領域の少なくとも一部(ヒトβ-アクチンの第3エクソンに相当する部分)が存在することが強く示唆されたので、まずこの部分の塩基配列を決定した。そして既知のアクチン遺伝子と比較することにより、遺伝子の方向、イントロンの有無、この領域がアクチンタンパクのどの部分をコードしているか等を推定した。ついで該領域から上流及び下流に向かって配列決定を行い最終的に図60にアンダーライン

(B)で示した全領域をカバーする、3748bpの塩基配列を決定した。尚、決定した全塩基配列及び予想される翻訳産物を図62に示した。該核酸配列及び翻訳産物のアミノ酸配列を既知のアクチンのものと比較解析した結果、以下のことが判明し、前記工程を経て、単離した遺伝子が真のアクチン遺伝子であるという確証を得た。

【0176】1) アクレモニウム・クリソゲナムのアクチン遺伝子は375個のアミノ酸からなる、分子量41800ダルトンのタンパクをコードする。この残基数は脊椎動物の骨格筋アクチン(α-タイプ)を除く、他のすべてのアクチンと同一である。

【0177】2) 塩基配列から予想されるアミノ酸配列は既知のアクチンのそれと極めてよく類似しており、サッカロミセス・セレビシエのアクチン、ヒトのγ-タイプアクチンとそれぞれ92%, 90%の相同性を示した。尚、上記のごとく単離し、構造を決定したNsiI-SalI断片(図60)はアクチン遺伝子の開始コドンから5'上流1293bpに及び領域をカバーしており、目的とするアクチンプロモーターは、該断片上に存在すると考えられる。以下に示す参考例2-(5),

(6)は上記推定が正しいことを強く支持した。
【0178】参考例2-(5)〔pACTHY83の構築〕

図64に示される工程に従って、細菌由来のハイグロマイシンBホストランスポゼータ遺伝子(以後HYBTM遺伝子と略記する。)をアクレモニウム・クリソゲナム由来のアクチンプロモーター支配下に発現させるためのプラスミドpACTHY83の構築した。以下に各工程を説明する。

【0179】(i) pACTΔNPの作製

参考例2-(4)-(ii)で得たプラスミドpACT5XをNsiIとPstIで同時に消化して5.3Kbの断片を調整した。次いで該断片をT4リガーゼを用いて再結合(自己閉環)させることにより、pACTΔNPを得た。

【0180】(ii) pACTB1, pACTB2, pACTB3の作製

(i)で得たpACTΔNPを先ずNcoIで消化し、生じた粘着末端をDNAポリメラーゼクレノウ断片(以後DNApol.と略記する。)と4種のデオキシヌクレオチド3リン酸(デオキシアデノシン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチジン三リン酸、チミジン三リン酸、以後4dNTPSと略記する。)を用いて平滑末端に変換する。次いで5'末端がリン酸化され、下記の配列からなるBamHI

リンカー(宝酒造販): 5' CCCGGATCCGGG 3', 3' GGCCCTAGGCC 5'を該末端にT4リガーゼで結合させた後、BamHIで消化した。該消化物をアガロースゲル電気泳動に供し、4KbのDNA断片を分離精製した。そして該断片をT4リガーゼにより自己閉環させpACTB1を得た。また上記リンカーとは配列及び塩基数の異なる2種のBamHIリンカー5' CCGGATCCGG 3', 3' GGCCCTAGGCC 5', 5' CGGATCCG 3', 3' GCCTAGGC 5': いずれも宝酒造販)を用いて同上の操作を行い、それぞれpACTB2, pACTB3を得た。

【0181】(iii) pACTCS1, pACTCS2, pACTCS3の作製

参考例2-(4)-(ii)で得たプラスミドpACTSSをBamHIで消化し、DNApol. と4dNTPSを用いて末端を平滑化した後、T4リガーゼで自己閉環させることにより、BamHI部位を失ったプラスミド、pACTSSΔBamを得た。次いで該プラスミドをScaIとEcoRIで消化し、アクチン遺伝子のターミネーターを含むと考えられる0.9Kbの断片を分離精製した。そして該断片をpACTBIのSmaI-EcoRI間に挿入することによりpACTCS1を得た。また同上の0.9Kbの断片をpACTB2, pACTB3のSmaI-EcoRI間に挿入することにより、pACTCS2, pACTCS3をそれぞれ取得した。これら3種のプラスミドは、アクレモニウム・クリソゲナム由来のアクチンプロモーター、ターミネーターを含む断片がユニーク制限酵素切断部位BamHI (アクチン開始コドンATGのすぐ下流に位置する。)を介して発現に好適な配置でつながった構造を有するプラスミドであり、種々の、目的遺伝子をアクレモニウム・クリソゲナム内で融合タンパクとして発現させるためのベクターを構築する際、有用な出発材料となる。これら3種のプラスミドのいずれかを用いることにより、所望の遺伝子をアクチン遺伝子と同じ読み枠で連結することが可能となる。

配列番号: 1

配列の長さ: 575

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列

Met	Leu	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly
1				5						10				15	
Phe	Pro	Ala	Pro	Ala	Glu	Pro	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Gln	Cys	Val	Glu
				20					25					30	
His	Asp	Cys	Phe	Ala	Leu	Tyr	Pro	Gly	Pro	Ala	Thr	Phe	Leu	Asn	Ala
				35					40					45	

【0182】(iv) pACTHY83の作製

プラスミドpLG83 (パストゥール研、ジュリアン・デービス (Julian Davies) 教授より入手) をBamHIで切断し、HYB⁺遺伝子を含む1.3Kbの断片を分離精製した。該断片をBamHIで消化し、アルカリホスファターゼ処理を施したpACTCS1と図64に示す方向で結合させることにより、pACTHY83を得た。尚、上記pLG83はHYB⁺遺伝子を有する酵母用のベクターであり、その諸性質は、公知の文献 [Critzら、Gene (1983) 25, 179~188] に記載されている。以上参考例2-(5)において、制限酵素消化断片の分離精製、プラスミドと該断片との連結、大腸菌の形質転換、並びにサブクローニングの結果得られたプラスミドの調製、解析等の基本操作はすべて参考例2-(2)と同様に行った。

【0183】

【発明の効果】本発明によれば、トロンビンの血液凝固及び血小板凝集作用に対する阻害作用及び/又は、トロンビンのプロテインC活性化の促進作用を有する上述した新規ペプチドが提供される。本発明は、トロンボモジュリンの投与方法として、静注によらない投与、例えば、経口投与、鼻腔投与を可能にする。

【0184】

【配列表】

69

Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
 50 55 60
 Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
 85 90 95
 Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
 100 105 110
 Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 115 120 125
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Gln
 130 135 140
 Ala Thr Val Pro Ser Gln Pro Ile Trp Gln Gln Gln Cys Gln Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Gln Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
 165 170 175
 Pro Leu Ala Val Gln Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Gln Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Gln Asn Gly Gly Cys Gln His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270

70

71

Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Gln Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 340 345 350
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 355 360 365
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 370 375 380
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 385 390 395 400
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 405 410 415
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 420 425 430
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
 485 490 495

72

Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
 500 505 510
 Val His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala Ser Leu Cys Leu
 515 520 525
 Val Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gln Gly
 530 535 540 545 550
 Ala Ala Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro Ser Lys Glu
 555 560 565 570 575
 Val Val Leu Gln His Val Arg Thr Glu Arg Thr Pro Gln Arg Leu

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1-(1)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13mp19TMJ3に、ディリーターT Md3が、相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図2】実施例1-(1)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13TMD3に、ディリーターT Md5が、相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図3】実施例1-(1)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13TMD3に、ディリーターT Md6が、相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図4】実施例1-(1)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13mp19TMJ3にディリーターT Md1が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図5】実施例1-(4)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1に、ミューターT Mm1が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミューターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図6】実施例1-(4)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13TMD1に、ミューターT Mm2が

相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミューターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図7~9】D123Asp, D123Ala及びD123Gluの各ペプチドについて、各カルシウムイオン濃度におけるトロンビンのプロテインC活性化を促進する活性を示したものである。●は、プロテインCを用いた場合、○は、GDPCを用いた場合である。

【図10】実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7に、ミューターT Mm3が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミューターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の置換が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図11~12】D456Asp, E456Gluの両ペプチドについて、各カルシウムイオン濃度におけるトロンビンのプロテインC活性化を促進する活性を示したものである。●は、プロテインCを用いた場合、○は、GDPCを用いた場合である。

【図13】実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7に、ミューターT Mm4が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミューターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の挿入が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図14】実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7に、ミューターT Mm5が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミューターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の挿入が起こっている部分の周辺の塩基配列と

それによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図15】実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13TMD7に、ミューター-TMm6が相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ミューターがプラスミドにハイブリダイズしてアミノ酸の挿入が起こっている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図16】実施例4-(5)で精製したペプチドE456Aspの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンの反応によって生成した活性型プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図17】実施例4-(5)で精製したペプチドE456Gluの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンの反応によって生成した活性型プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図18】実施例4-(5)で精製したペプチドE456Asp2の存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンの反応によって生成した活性型プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図19】実施例4-(5)で精製したペプチドE456Asp3の存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンの反応によって生成した活性型プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図20】実施例4-(5)で精製したペプチドE456GluAspの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンの反応によって生成した活性型プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図21】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456Aspを添加したフィブリノーゲン液の凝固時間と精製したペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

【図22】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456Gluを添加したフィブリノーゲン液の凝固時間と精製したペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

【図23】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456Asp2を添加したフィブリノーゲン液の凝固時間と精製したペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

【図24】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456Asp3を添加したフィブリノーゲン液の凝固時間と精製したペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

【図25】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456GluAspを添加したフィブリノーゲン液

の凝固時間と精製したペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

【図26】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456Aspの非存在下(A)及び存在下(B)におけるトロンビン惹起による血小板凝集と時間の関係を示すグラフである。

【図27】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456Gluの非存在下(A)及び存在下(B)におけるトロンビン惹起による血小板凝集と時間の関係を示すグラフである。

【図28】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456Asp2の非存在下(A)及び存在下(B)におけるトロンビン惹起による血小板凝集と時間の関係を示すグラフである。

【図29】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456Asp3の非存在下(A)及び存在下(B)におけるトロンビン惹起による血小板凝集と時間の関係を示すグラフである。

【図30】実施例4-(5)で精製した本発明のペプチドE456GluAspの非存在下(A)及び存在下(B)におけるトロンビン惹起による血小板凝集と時間の関係を示すグラフである。

【図31】プラスミドpSV2PTTMM3の作製過程を示す。

【図32】プラスミドpSV2PTTMM6の作製過程を示す。

【図33~34】実施例5-(4)で精製した本発明のペプチドE456Gla及び実施例3-(3)で精製した本発明のペプチドE456Gluの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンとの反応によって生成した活性化プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図35】実施例5-(4)で精製した本発明のペプチドE456GlaAspの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンとの反応によって生成した活性化プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図36】実施例5-(4)で精製した本発明のペプチドE456Glaを添加したフィブリノーゲン液の凝固時間と精製したペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

【図37】実施例5-(4)で精製した本発明のペプチドE456GlaAspを添加したフィブリノーゲン液の凝固時間と精製したペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

【図38】実施例5-(4)で精製した本発明のペプチドE456Glaの非存在下(A)及び存在下(B)におけるトロンビン惹起による血小板凝集と時間の関係を示すグラフである。

【図39】実施例5-(4)で精製した本発明のペプチ

ドE456G1aAspの非存在下(A)及び存在下(B)におけるトロンビン惹起による血小板凝集と時間の関係を示すグラフである。

【図40】プラスミドpUMPGTMD7の作製過程を示したものである。

【図41】プラスミドpMTMD7の作製過程を示したものである。

【図42】プラスミドpUMPGTMM3の作製過程を示す。

【図43】プラスミドpMTMM3の作製過程を示す。

【図44~45】実施例6-(4)で精製した本発明のペプチドE456Asp及びE456Gluの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンとの反応によって生成した活性化プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図46~47】実施例6-(4)で精製した本発明のペプチドE456AspまたはE456Gluを添加したフィブリノーゲン液の凝固時間と精製した各々のペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

【図48~49】実施例6-(4)で精製した本発明のペプチドE456Asp及びE456Gluの非存在下(A)及び存在下(B)におけるトロンビン惹起による血小板凝集と時間の関係を示すグラフである。

【図50】実施例8-(2)で精製したペプチドE456Aspの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンの反応によって生成した活性型プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図51】実施例8-(4)で精製したペプチドE456Aspの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンの反応によって生成した活性型プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図52】実施例8-(5)で精製したペプチドE456Aspの存在下(O)、非存在下(●)におけるプロテインCとトロンビンの反応によって生成した活性型プロテインCの量と反応時間の関係を示すグラフである。

【図53】実施例8-(2), (4), (5)で精製したペプチドE456AspのSDS-ポリアクリルアミド電気泳動パターンモード図である。

【図54】実施例1-(1)-(b)で得られた組換え体プラスミドM13mp19TMD7に、ディリーターTMd9が、相補的にハイブリダイズしているところを示すものであり、ディリーターがプラスミドにハイブリダイズしている周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

【図55(a)-(b)】ヒトトロンボモジュリンペプチドの全アミノ酸配列を示す。

【図56】プラスミドpPGACY2の作製過程を示す。

【図57】pSFI-1及びpSFI-2の作製過程を示す。

【図58】アクレモニウム・クリソゲナム導入用コスミドpBSFAHY83の作製過程を示す。尚、これらのプラスミド上に存在するセファロスポリリンC・アシラーゼ発現単位は→で示した。図56~58中で使用した略号は以下のとおりのものである。B: BamHIとBglIIの連結部位/cm: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子/Amp: β-ラクタマーゼ遺伝子/acy11: SE-83由来のセファロスポリリンC・アシラーゼ遺伝子/PGKP: アクレモニウム・クリソゲナム由来PGK遺伝子のプロモーター/PGKT: アクレモニウム・クリソゲナム由来PGK遺伝子のターミネーター/ACTP: アクレモニウム・クリソゲナム由来アクチン遺伝子のプロモーター/ACTT: アクレモニウム・クリソゲナム由来アクチン遺伝子のターミネーター/km: ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子/HYB: ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子。

【図59】アクレモニウム・クリソゲナムPGK遺伝子を含むDNA断片の制限酵素地図を示す。

20 【図60】アクレモニウム・クリソゲナムアクチン遺伝子を含むDNA断片の制限酵素地図を示す。図59, 60中の—はそれぞれの遺伝子のエキソンを示す。尚、それぞれの遺伝子において第1エキソンの5'末端、及び最終エキソンの3'末端は不明である。

【図61】図59中—で示した(A)領域の塩素配列を示す。また予想されるPGKタンパクのアミノ酸配列を塩基配列の下段に示した。

30 【図62】図60中—で示した(B)領域の塩素配列を示す。また予想されるアクチンタンパクのアミノ酸配列を塩基配列の下段に示した。

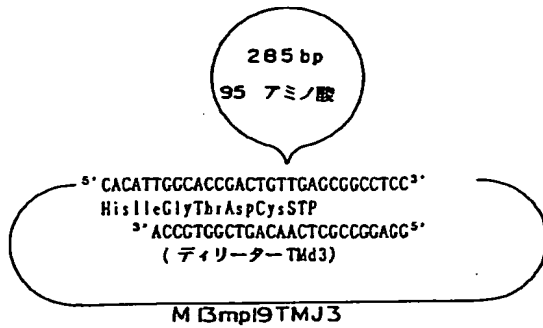
【図63】プラスミドpPGKM5の作製過程を示す。

40 【図64】プラスミドpACTHY83の作製過程を示す。尚、図中で新たに使用した略称ないし略号は、以下のとおりのものである。/P: PvuII/Ps: PstI/M: MluI/K: KpnI/S: SmaI/Sa: SalI/St: StuI/Sc: ScaI/X: XhoI/Xb: XbaI/N: NsiI/Nc: NcoI/E: EcoRI/RV: EcoRV/H: HindIII/Bs: BssHII/PS: Ns: PstIとNsiIとの結合部位/2μ or i: 酵母2μプラスミドの複製起点/CYCP: 酵母のイソ-1-チトクロームC遺伝子のプロモーター/CYCT: 酵母のイソ-1-チトクロームC遺伝子のターミネーター/PGKP: アクレモニウム・クリソゲナムPGK遺伝子のプロモーター/PGKT: アクレモニウム・クリソゲナムPGK遺伝子のターミネーター/ACTP: アクレモニウム・クリソゲナムアクチン遺伝子のプロモーター/ACTT: アクレモニウム・クリソゲナムアクチン遺伝子のターミネーター/GAPDP: アクレモニウム・クリソゲナムGAPD遺伝子のプロモーター/L: BglII li

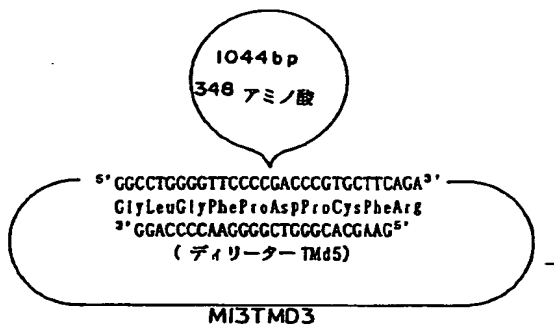
79

nker (GGAAGATCTTCC) 挿入部位

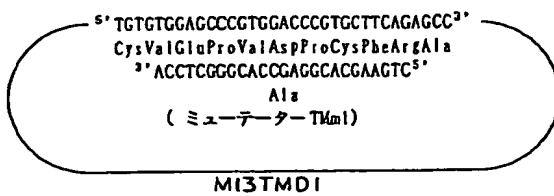
【図1】



【図2】

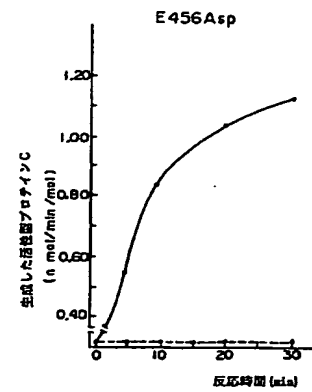


【図5】

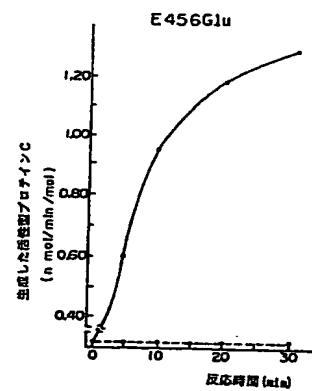


80

【図16】



【図17】

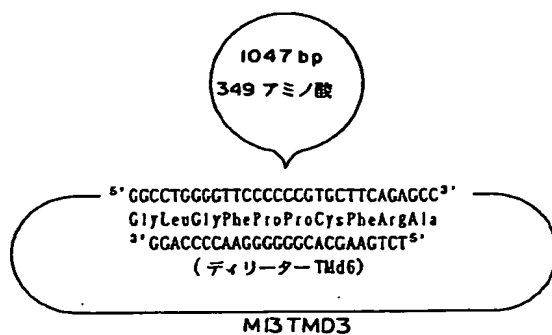


(42)

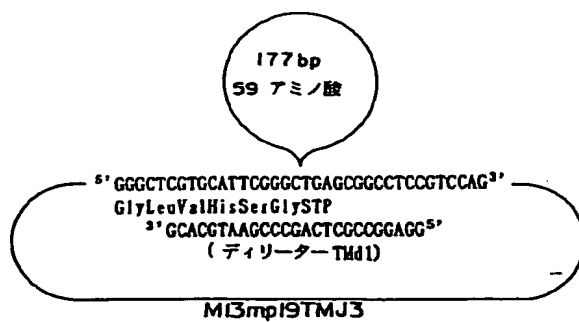
81

82

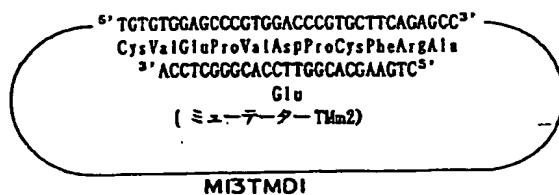
【図3】



【図4】



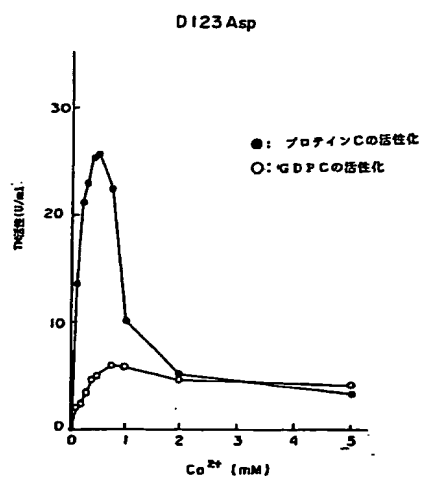
【図6】



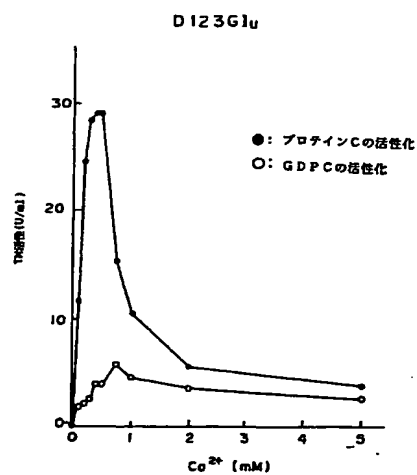
(43)

83

【図7】

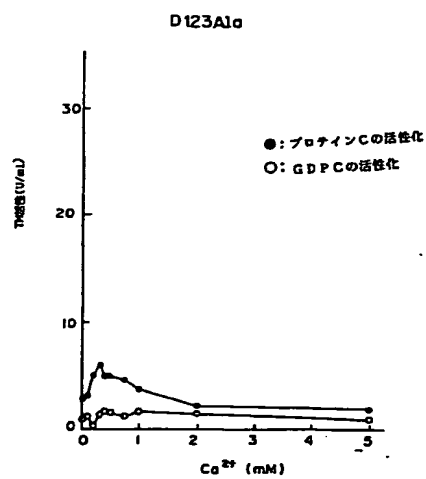


【図9】

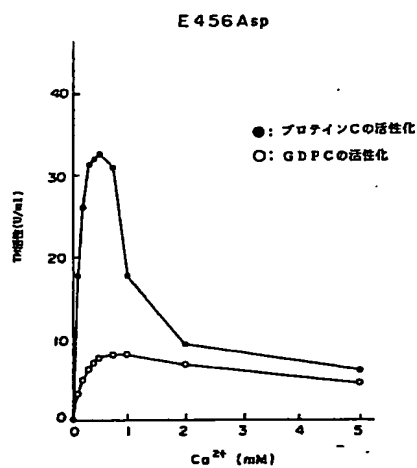


84

【図8】

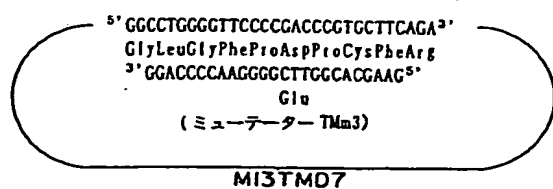


【図11】

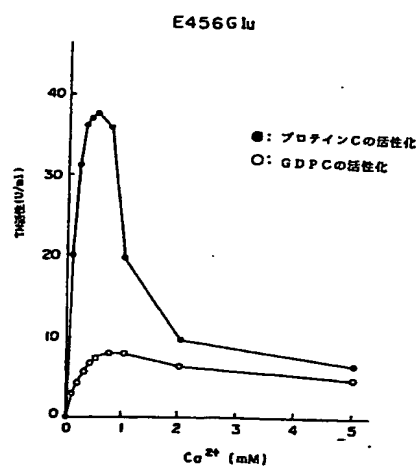


85

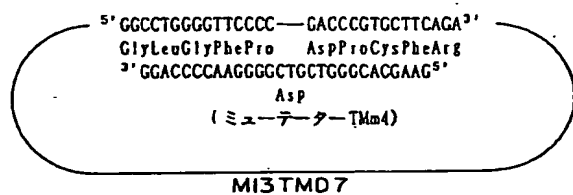
【図10】



【図12】

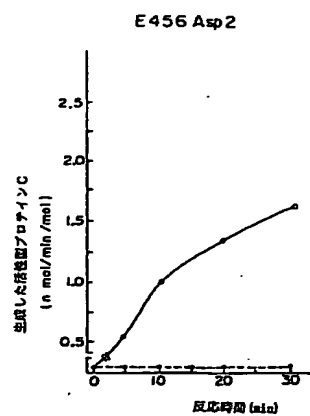


【図13】

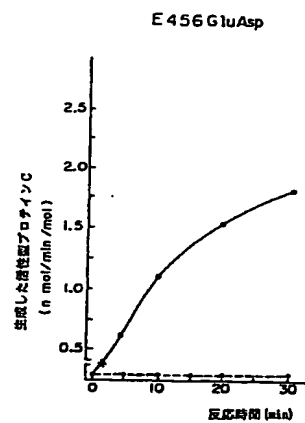


86

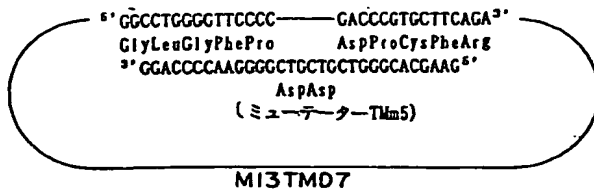
【図18】



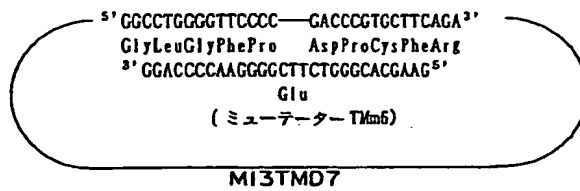
【図20】



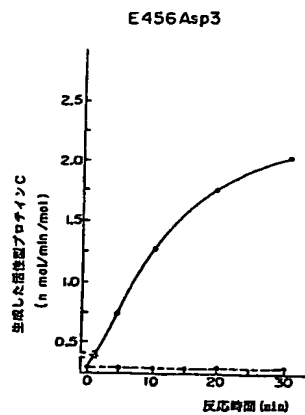
【図14】



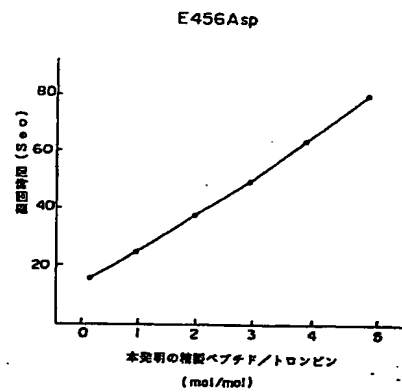
【図15】



【図19】



【図21】

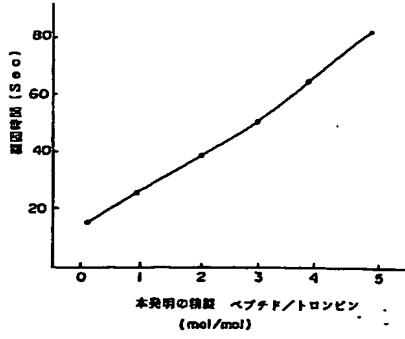


(46)

89

【図22】

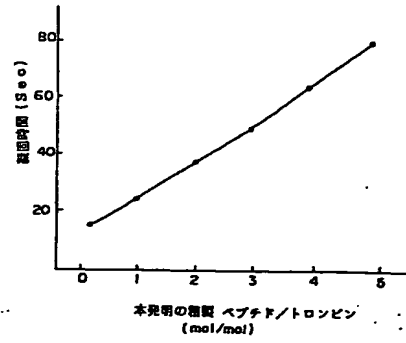
E456Glu



90

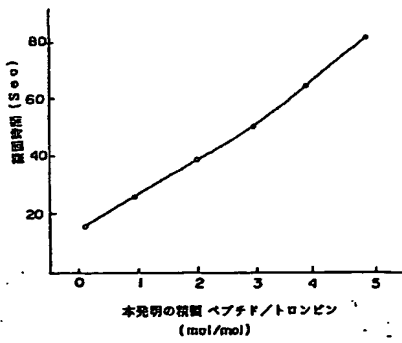
【図23】

E456 Asp2



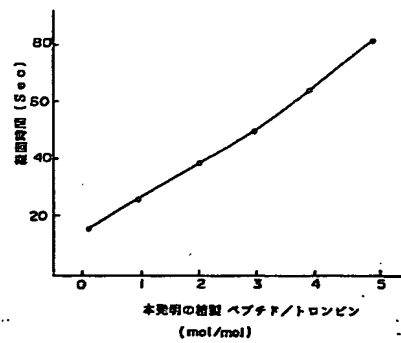
【図24】

E456Asp3

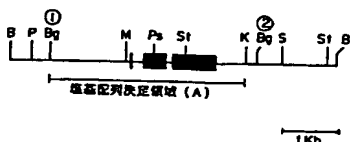


【図25】

E456GluAsp

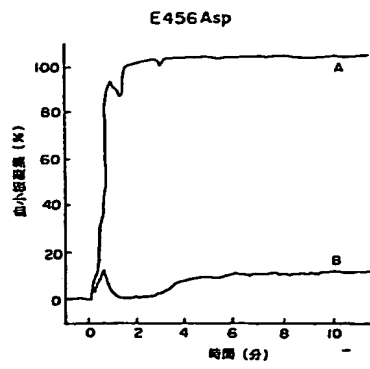


【図59】



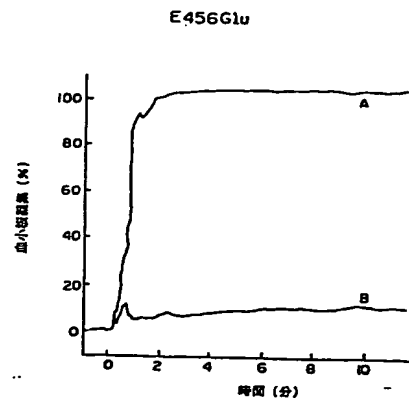
91

【図26】

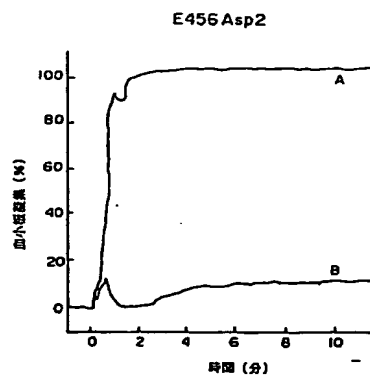


92

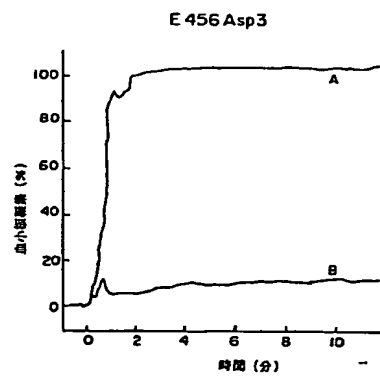
【図27】



【図28】



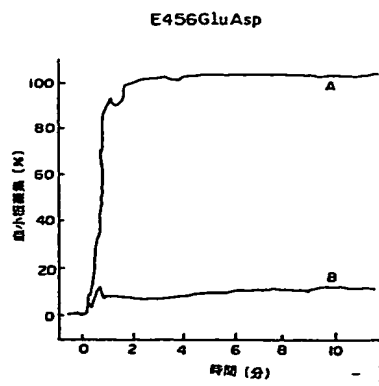
【図29】



(48)

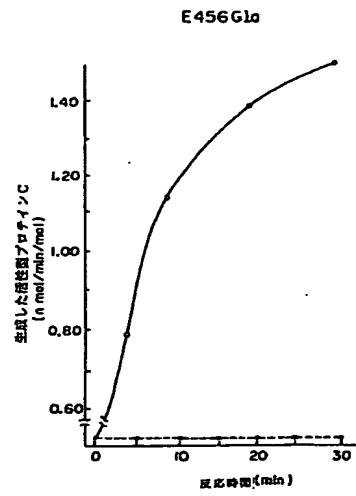
93

【図30】



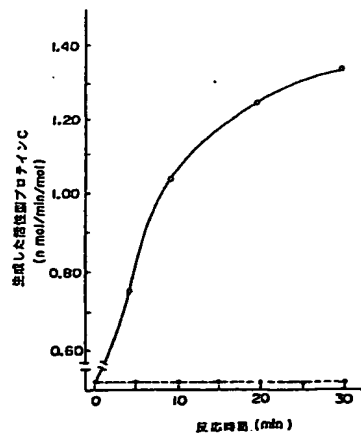
94

【図33】



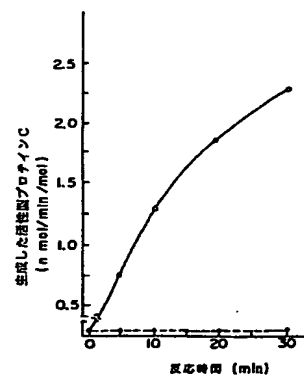
【図34】

E456Glu



【図35】

E456GluAsp



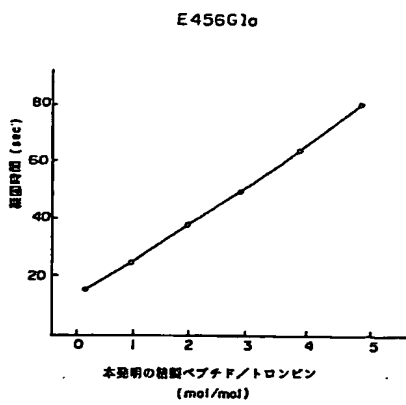
【図 3 2】



(51)

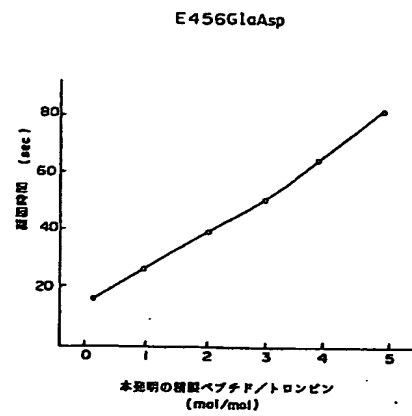
99

【図36】

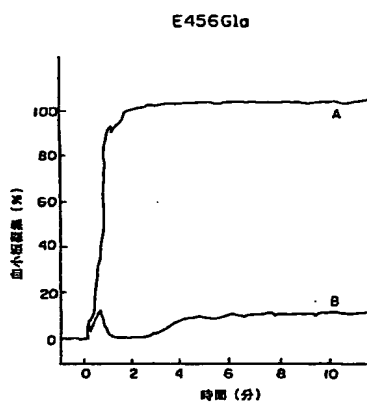


100

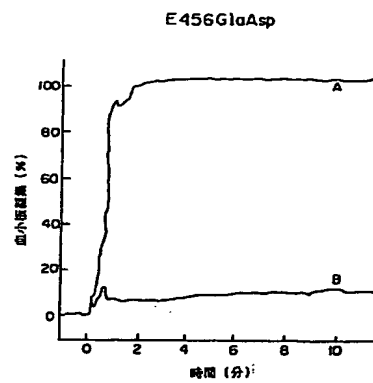
【図37】



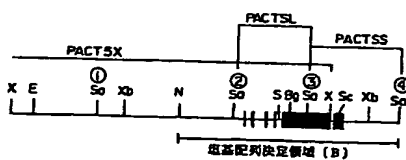
【図38】



【図39】



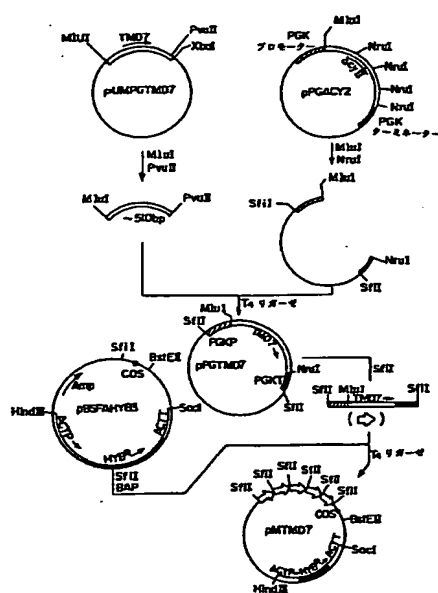
【図60】



(53)

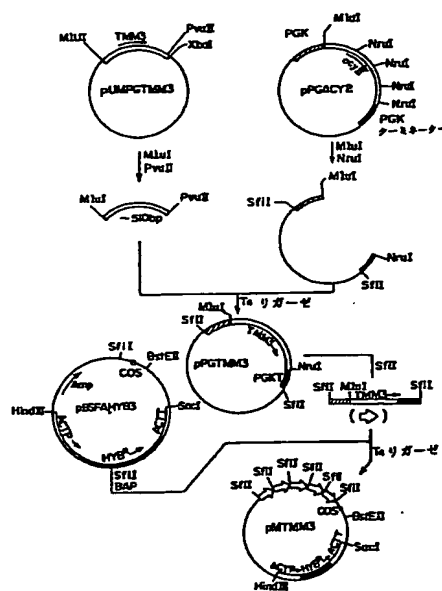
103

【図41】



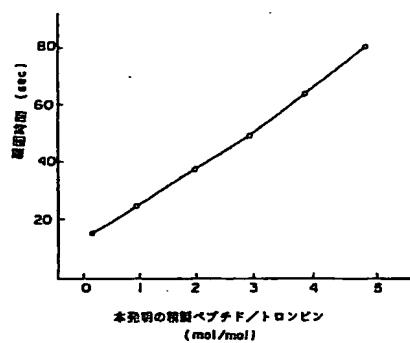
104

【図43】

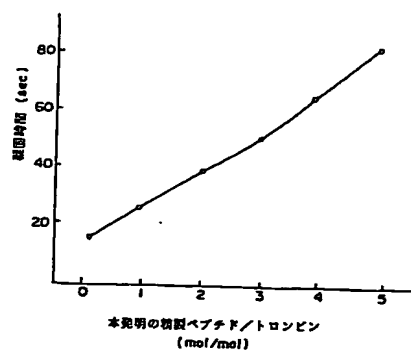


30

【図46】

E456A_{sp}

【図47】

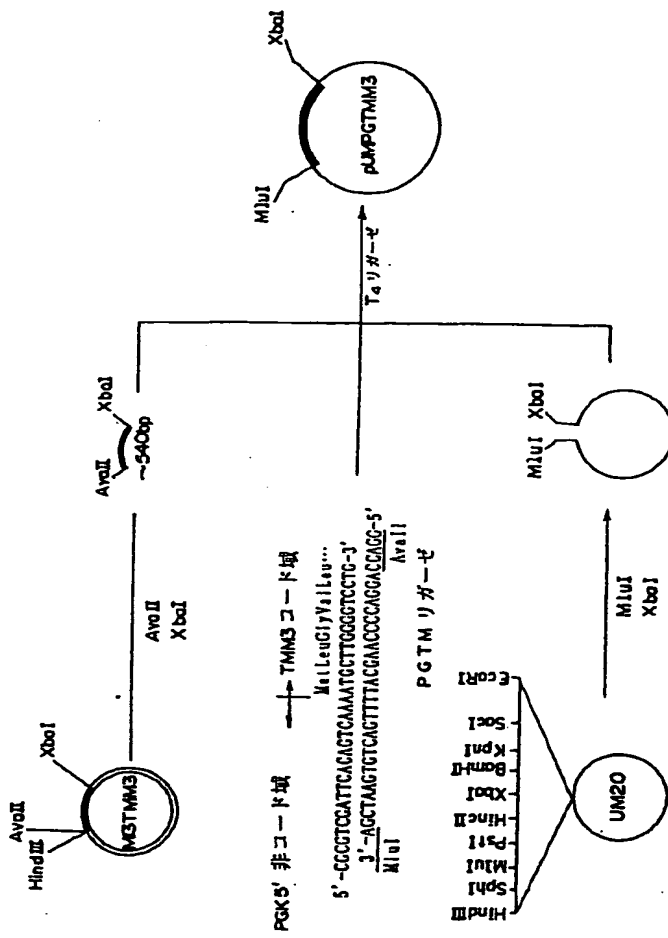
E456G_{lu}

(54)

105

106

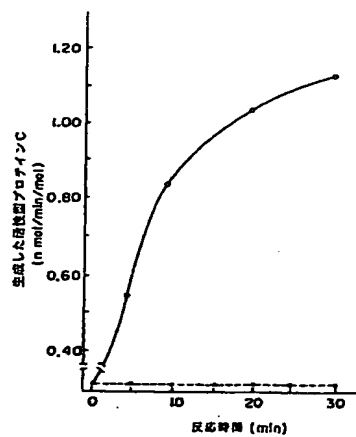
【図42】



107

【図44】

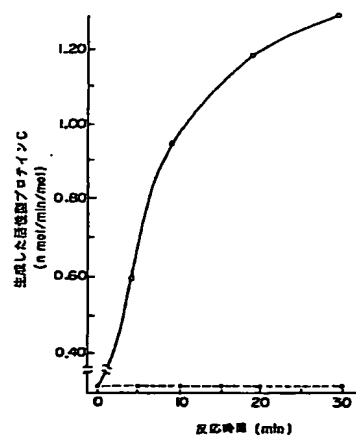
E456Asp



108

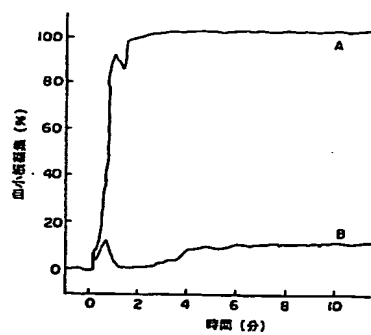
【図45】

E456Glu



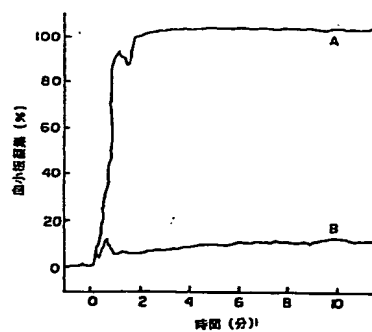
【図48】

E 456Asp



【図49】

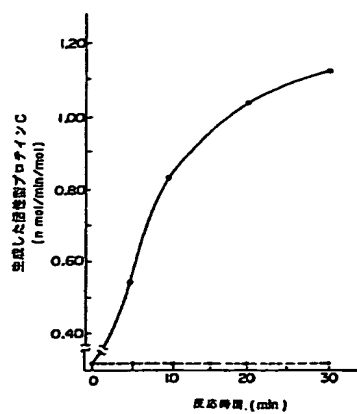
E456Glu



(56)

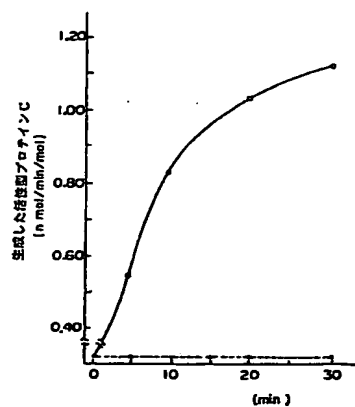
109

【図50】

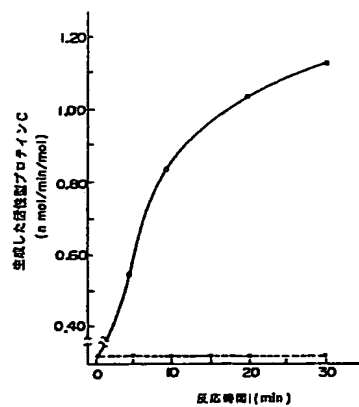


110

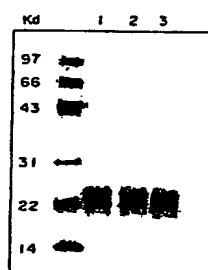
【図51】



【図52】



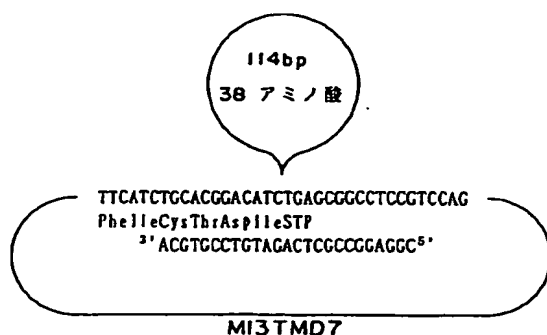
【図53】



111

112

【図54】



【図55b】

361 380
GluCysValGluProValAspProCysPheArgAlaAsnCysGluTyrGlnCysGlnPro

381 400
LeuAsnGlnThrSerTyrLeuCysValCysAlaGluGlyPheAlaProIleProHisGlu

401 420
ProHisArgCysGlnMetPheCysAsnGlnThrAlaCysProAlaAspCysAspProAsn

421 440
ThrGlnAlaSerCysGluCysProGluGlyTyrIleLeuAspAspGlyPheIleCysThr

441 460
AspIleAspGluCysGluAsnGlyGlyPheCysSerGlyValCysHisAsnLeuProGly

461 480
ThrPheGluCysIleCysGlyProAspSerAlaLeuValArgHisIleGlyThrAspCys

481 500
AspSerGlyLysValAspGlyGlyAspSerGlySerGlyGluProProProSerProThr

501 520
ProGlySerThrLeuThrProProAlaValGlyLeuValHisSerGlyLeuLeuIleGly

521 540
IleSerIleAlaSerLeuCysLeuValValAlaLeuLeuAlaLeuLeuCysHisLeuArg

541 560
LysLysGlnGlyAlaAlaArgAlaLysMetGluTyrLysCysAlaAlaProSerLysGlu

561
ValValLeuGlnHisValArgThrGluArgThrProGlnArgLeu

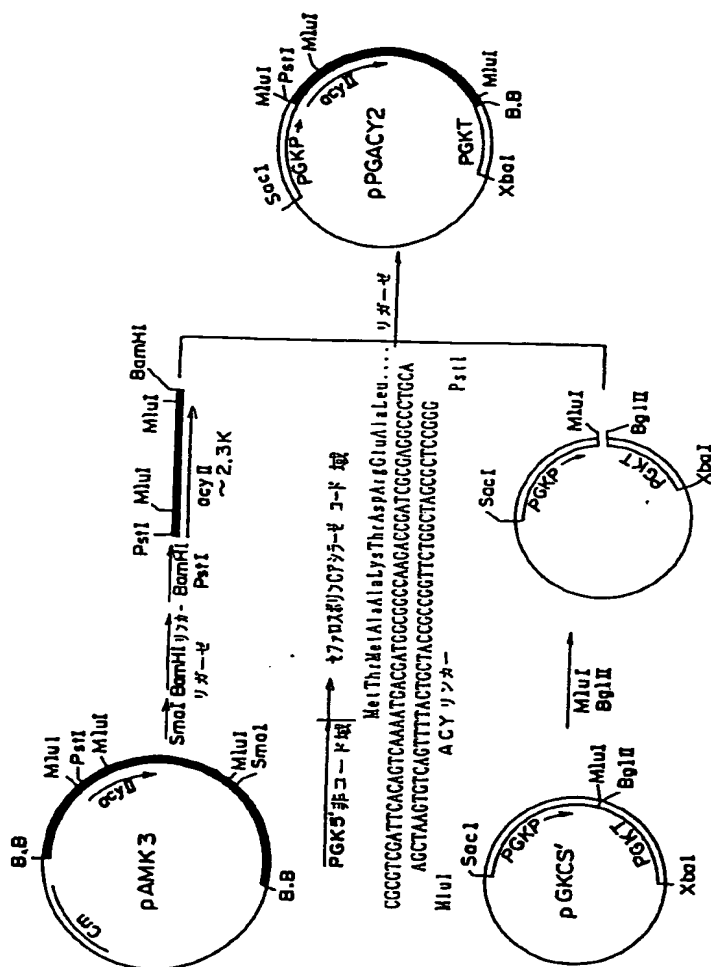
[図55a]

```

1      20
MetLeuGlyValLeuValLeuGlyAlaLeuAlaLeuAlaGlyLeuGlyPheProAlaPro
21      40
AlaGluProGlnProGlyGlySerGlnCysValGluHisAspCysPheAlaLeuTyrPro
41      60
GlyProAlaThrPheLeuAsnAlaSerGlnIleCysAspGlyLeuArgGlyHisLeuMet
61      80
ThrValArgSerSerValAlaAlaAspValIleSerLeuLeuLeuAsnGlyAspGlyGly
81      100
ValGlyArgArgArgLeuTrpIleGlyLeuGlnLeuProProGlyCysGlyAspProLys
101     120
ArgLeuGlyProLeuArgGlyPheGlnTrpValThrGlyAspAsnAsnThrSerTyrSer
121     140
ArgTrpAlaArgLeuAspLeuAsnGlyAlaProLeuCysGlyProLeuCysValAlaVal
141     160
SerAlaAlaGluAlaThrValProSerGluProIleTrpGluGluGlnGlnCysGluVal
161     180
LysAlaAspGlyPheLeuCysGluPheHisPheProAlaThrCysArgProLeuAlaVal
181     200
GluProGlyAlaAlaAlaAlaAlaValSerIleThrTyrGlyThrProPheAlaAlaArg
201     220
GlyAlaAspPheGlnAlaLeuProValGlySerSerAlaAlaValAlaProLeuGlyLeu
221     240
GlnLeuMetCysThrAlaProProGlyAlaValGlnGlyHisTrpAlaArgGluAlaPro
241     260
GlyAlaTrpAspCysSerValGluAsnGlyGlyCysGluHisAlaCysAsnAlaIlePro
261     280
GlyAlaProArgCysGlnCysProAlaGlyAlaAlaLeuGlnAlaAspGlyArgSerCys
281     300
ThrAlaSerAlaThrGlnSerCysAsnAspLeuCysGluHisPheCysValProAsnPro
301     320
AspGlnProGlySerTyrSerCysMetCysGluThrGlyTyrArgLeuAlaAlaAspGln
321     340
HisArgCysGluAspValAspAspCysIleLeuGluProSerProCysProGlnArgCys
341     360
ValAsnThrGlnGlyGlyPheGluCysHisCysTyrProAsnTyrAspLeuValAspGly

```

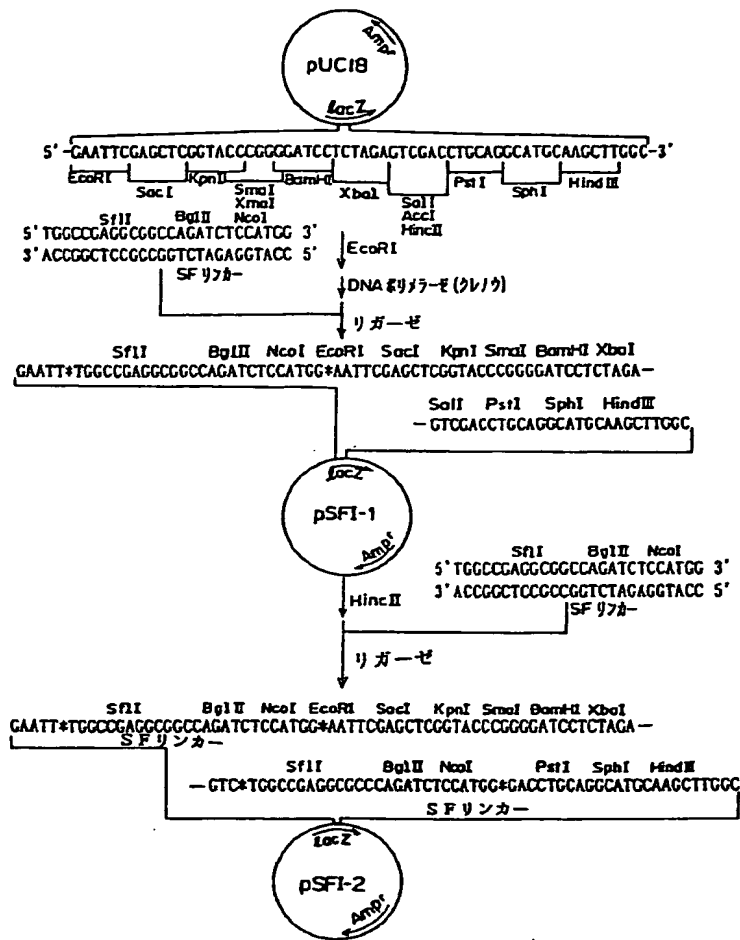
【図56】



117

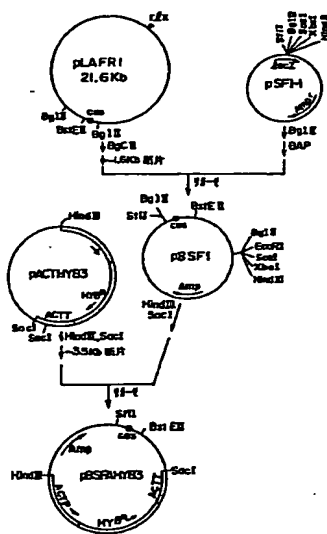
118

[図57]



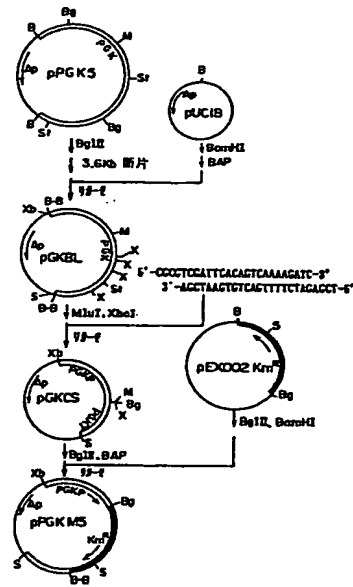
119

【図58】



120

【図63】



【图 6 1】

[illegible]

【图 6 2】

[illegible]

(65)

127

128

C 1 2 P	21/02	C	8214-4B
// C 0 7 K	7/08		8318-4H
(C 1 2 N	1/15		
C 1 2 R	1:645)		
(C 1 2 N	1/21		
C 1 2 R	1:01)		
(C 1 2 P	21/02		
C 1 2 R	1:01)		
(C 1 2 P	21/02		
C 1 2 R	1:91)		
(C 1 2 P	21/02		
C 1 2 R	1:645)		
C 0 7 K	99:00		

(72)発明者 鈴木 宏治
三重県津市浜町6丁目4-35

(72)発明者 松田 昭生
静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業
株式会社内